

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Schwarz)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung der Photodynamischen Inaktivierung von
Trichophyton rubrum anhand von
Curcumin in unterschiedlicher Galenik**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

Viktoria Juliane Mahn

aus Hamburg

Kiel 2019

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Jochen Brasch, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

2. Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Hanna Kaduszkiewicz, Institut für Allgemeinmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 20.01.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Summen- und Strukturformel von Curcumin	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Belichtungsaufbaus.....	22
Abbildung 3: Schema 96-Well Mikrotiterplatte	23
Abbildung 4: Beschickung der 96-Well Mikrotiterplatte mit Myzelfragmenten, Konidien, Puffer, DMSO, Curcumin, Fluconazol und Sabouraud-Lösung	25
Abbildung 5: Wachstumsverlauf unter Curcumin/DMSO, unbestrahlt, Tag 0 bis 9	32
Abbildung 6: Wachstumsverlauf unter Curcumin/micelliert, unbestrahlt, Tag 0 bis 9 .	34
Abbildung 7: Wachstumsverlauf unter Curcumin/DMSO, bestrahlt, Tag 0 bis 9	36
Abbildung 8: Wachstumsverlauf unter Curcumin/micelliert, bestrahlt, Tag 0 bis 9.....	38
Abbildung 9: Tag 9, bestrahlt	40
Abbildung 10: Wachstum unter Curcumin, bestrahlt, Tag 0 bis 9	42
Abbildung 11: Cur 1, Tag 9, bestrahlt	44
Abbildung 12: Effekt der Bestrahlung bei Zugabe von Curcumin/DMSO im Vergleich zu Curcumin/micelliert	45
Abbildung 13: Curcumin/DMSO, Curcumin/micelliert, Stämme	47
Abbildung 14: Curcumin/DMSO, Curcumin/micelliert	49
Abbildung 15: <i>T. rubrum</i> (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 4, Myzel unter Cur 1/micelliert (Curcumin micelliert 5mg/l in Phosphatpuffer)	57
Abbildung 16: <i>T. rubrum</i> (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 4, Myzel unter Cur 1/DMSO (Curcumin 5mg/l in 1% DMSO/Puffer)	58
Abbildung 17: <i>T. rubrum</i> (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 4, Myzel unter Fluc (Fluconazol 0,5mg/ml in Aqua destillata)	59
Abbildung 18: <i>T. rubrum</i> (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 9, Myzel unter Cur 1/micelliert (Curcumin micelliert 5mg/l in Phosphatpuffer)	60
Abbildung 19: <i>T. rubrum</i> (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 9, Myzel unter Cur 1/DMSO (Curcumin 5mg/l in 1% DMSO/Puffer)	61
Abbildung 20: <i>T. rubrum</i> (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 9, Myzel unter Fluc (Fluconazol 0,5mg/ml in Aqua destillata)	62
Abbildung 21: Myzelwachstum der gepoolten mit Fluconazol behandelten Konidien, Tag 8	63
Abbildung 22: Myzelwachstum des gepoolten mit Fluconazol behandelten Myzels, Tag 8	64
Abbildung 23: Myzelwachstum der gepoolten mit Cur 2/DMSO behandelten Konidien, Tag 8	64
Abbildung 24: Myzelwachstum des gepoolten mit Cur 2/DMSO behandelten Myzels, Tag 8	65

Abbildung 25: Fehlendes Myzelwachstum der gepoolten mit Cur 1/DMSO behandelten Konidien, Tag 8.....	66
Abbildung 26: Fehlendes Myzelwachstum des gepoolten mit Cur 1/DMSO behandelten Myzels, Tag 8.....	66

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Pilze	1
1.2 Dermatophytosen	2
1.3 Antimykotische Therapie	4
1.4 Curcumin	8
1.5 DMSO (Dimethylsulfoxid)	10
1.6 Optische Strahlung	11
1.7 Photodynamische Therapie	13
1.8 Antimykotische Therapie mit Curcumin und Licht	14
1.9 Fragestellung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Versuchskonzept	17
2.2 Dermatophyten	17
2.3 Gewinnung der Konidien und des Myzels	18
2.4 Herstellung der Curcuminlösungen	20
2.5 Belichtungsaufbau	21
2.6 Versuchsaufbau	23
2.7 Statistische Methoden	28
3 Ergebnisse	30
3.1 Vorversuche	30
3.2 Hauptversuche	31
3.2.1 Dermatophytenwachstumsverlauf von Tag 0 bis Tag 9	31
3.2.2 Wachstumsverhalten der 5 eingesetzten <i>T. rubrum</i> Stämme unter der Behandlung mit Cur 1/DMSO , Cur 2/DMSO sowie Fluconazol an Tag 9	40
3.2.3 Einfluss von Cur 1/DMSO gegenüber Cur 1/micelliert auf den Wachstumsverlauf von <i>T. rubrum</i> über 9 Tage Inkubationszeit	42
3.2.4 Einfluss von Cur 1/DMSO gegenüber Cur 1/micelliert auf den Wachstumsverlauf des Myzels und der Konidien von <i>T. rubrum</i> an Tag 9	44
3.2.5 Der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung	45

3.2.6	Einfluss auf die Wachstumshemmung von <i>T. rubrum</i> -Stamm, Art des Inokulums und Curcumin, dargestellt anhand von F-Tests	51
3.2.7	Unterschied zwischen Curcumin/DMSO und Curcumin/micelliert bezüglich des absoluten Effektes der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung für die höchste eingesetzte Curcuminkonzentration Cur 1	55
3.2.8	Mikroskopische Darstellung der Myzeldichte von <i>T. rubrum</i> unter dem Einfluss von Cur 1/micelliert, Cur 1/DMSO und Fluconazol jeweils nach erfolgter Bestrahlung (20 J/cm ²) an Tag 4 (104 Stunden nach Bestrahlung)	57
3.2.9	Mikroskopische Darstellung der Myzeldichte von <i>T. rubrum</i> unter dem Einfluss von Cur 1/micelliert, Cur 1/DMSO und Fluconazol jeweils nach erfolgter Bestrahlung (20 J/cm ²) an Tag 9 (216 Stunden nach Bestrahlung)	60
3.2.10	Makroskopische Darstellung des Wachstums von <i>T. rubrum</i> unter dem Einfluss von Cur 1/DMSO, Cur 2/DMSO und Fluconazol jeweils nach erfolgter Bestrahlung (20 J/cm ²), Tag 8	63
4	Besprechung der Ergebnisse (Diskussion)	68
4.1	Effekt alleiniger Belichtung auf das Wachstumsverhalten von <i>T. rubrum</i>	68
4.2	Effekt des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) auf das Wachstumsverhalten von <i>T. rubrum</i>	70
4.3	Wasserlöslichkeit und Lichtempfindlichkeit der beiden unterschiedlichen Curcuminformulierungen	70
4.4	Effekte von unbelichtetem Curcumin auf das Wachstum von <i>T. rubrum</i>	71
4.5	Effekte von photodynamisch aktiviertem Curcumin auf das Wachstum von <i>T. rubrum</i>	72
4.6	Empfindlichkeit von Myzel und Konidien gegenüber den eingesetzten Curcuminformen	75
4.7	Ausblick	75
5	Zusammenfassung	78
Anhang		80
A	Tabellen	80
B	Kodierung	84
	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung	93

Eidesstattliche Erklärung	94
---------------------------------	----

1 Einleitung

1.1 Pilze

Pilze oder auch Mycetes, Fungi sind der Gruppe der eukaryoten Mikroorganismen zuzuordnen und bilden hierbei ein eigenes Unterreich (Subregnum Mycobionta). Der Entwicklungsbeginn der Eukarya liegt ca. 1 Mrd. Jahre zurück.

Die Morphologie der Pilze ist einfacher als die der Tiere, allerdings komplexer als die Morphologie der Bakterien. Pilze besitzen einen Zellkern und weitere Zellorganellen wie Mitochondrien, einen Golgi-Apparat und ein endoplasmatisches Retikulum. Die Zellwand der Pilze besteht aus miteinander vernetzten komplexen Kohlenhydraten, u.a. Chitin, Glukanen und Mannan, die der Zelle mechanische Stabilität verleihen. Die zum Zellinneren gelegene Zellmembran besteht wie beim Menschen aus einer Phospholipiddoppelschicht, allerdings mit dem Unterschied, dass bei den Pilzen zusätzlich der Bestandteil Ergosterol eingebaut wird. Dieser und weitere Unterschiede zwischen der Beschaffenheit der Pilzzelle und dem Aufbau der menschlichen Zelle stellen wesentliche Angriffspunkte in der aktuellen antimykotischen Therapie dar.

Pilze ernähren sich heterotroph, indem sie Enzyme sezernieren, mit denen sie verwertbare Nährstoffe aus dem sie umgebenden Substrat lösen können und durch ihre Zellwand hindurch aufnehmen können (Groß 2009: 139; Suerbaum et al. 2016: 609).

Die Vermehrung der Pilze kann sexuell mittels Meiose stattfinden, dann spricht man von Fungi perfecti oder teleomorphen Pilzen. In vielen Fällen findet die Fortpflanzung allerdings asexuell mittels Mitosporen statt, in diesem Fall spricht man von Fungi imperfecti bzw. anamorphen Pilzen (Suerbaum et al. 2016: 610). Bei einer Vielzahl von Pilzen, v.a. den humanpathogenen Myceten, ist das perfekte Stadium bislang nicht bekannt, sodass sie in die Klasse der Deuteromyceten (Fungi imperfecti) eingeordnet werden (Groß 2009: 140).

Die humanpathogenen Pilze können nach dem DHSB System eingeteilt werden in Dermatophyten, Hefepilze, Schimmelpilze und biphasische Pilze. Die meisten Vertreter der

humanpathogenen Pilze führen nur bei immungeschwächten Personen zu opportunistischen Infektionen, dies gilt besonders für Hefe- und Schimmelpilze. Dermatophyten hingegen können auch bei Immunkompetenten zu Pilzinfektionen führen (Groß 2009: 139).

1.2 Dermatophytosen

Dermatophyten sind die Erreger der Dermatophytosen, die auch als Tinea bezeichnet werden und Infektionen der verhornten Haut, Haare oder Nägel beschreiben (Hof und Dörries 2014: 475). Die taxonomische Einteilung der Dermatophyten wurde erstmalig 1841 anhand von Studien von Robert Remak und David Gruby vorgenommen. Seit 1934 erfolgte die Einteilung in 3 unterschiedliche Gattungen: *Microsporum*, *Epidermophyton* und *Trichophyton*. Gemeinsam ist diesen 3 Gattungen die klinische Entität, der sich makroskopisch ähnlich präsentierenden Hautinfektionen. Ausschlaggebendes Unterscheidungsmerkmal stellte früher v.a. die mikroskopisch sichtbare Morphologie der Makrokonidien dar (Suerbaum et al. 2016: 631). Die Einteilung der Dermatophyten anhand morphologischer Merkmale *in vitro* zeigte sich als valides diagnostisches Instrument bei frischen Isolaten. Rückblickend wies dieses Verfahren allerdings deutliche Schwächen gegenüber heutiger genetischer Diagnostik auf, da es aufgrund rascher Degeneration und Mutation häufig zu fälschlicher Einteilung mutierter Dermatophyten in eigenständige Taxa kam. Bevor allerdings genetische Diagnostik eingesetzt werden konnte, etablierten Weitzman et al. weitere diagnostische Parameter zur Identifikation und Klassifikation der Dermatophyten wie die Fähigkeit des Stammes essentielle Vitamine aus der Agarplatte aufzunehmen, die Wachstumstemperatur sowie die Fähigkeit Gelatine zu verflüssigen. Eine weitere Möglichkeit Dermatophyten zu klassifizieren ist die Einteilung anhand ihres natürlichen Habitats. Hierbei können 3 Gruppen unterschieden werden: anthropophile, zoophile und geophile Dermatophyten. Diese Einteilung ist von erheblicher klinischer Relevanz, da Infektionen von Menschen durch anthropophile Dermatophyten meist mild und chronisch verlaufen, während zoophile und geophile Dermatophyten beim Menschen akute, hochentzündliche Infektionen auslösen. De Hoog et al. konnten anhand genetischer Analysen neue Erkenntnisse gewinnen und stellten eine auf diesen Erkenntnissen basierende neue taxonomische Einteilung vor. Die resultierende phylogenetische Einteilung zeigte in einigen Bereichen Übereinstimmung mit der

bisherigen etablierten Einteilung der Dermatophyten. Allerdings zeigten die Analysen auch Erkenntnisse, die zu Abweichungen von der bisherigen Einteilung führten. So klassifiziert die neue Einteilung von de Hoog et al. die Dermatophyten in die Gruppen: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Microsporum*, *Lophophyton*, *Arthroderma* sowie *Ctenomyces*. Zudem wurden 2 neue Gattungen vorgestellt: *Guarromyces* und *Paraphyton* (de Hoog et al. 2017: 5–13).

Abhängig von der Lokalisation einer Tinea wird diese genauer bezeichnet: Tinea pedis (Infektion des Fußes), Tinea manum (Infektion der Hand), Tinea inguinalis (Infektion der Leiste), Tinea corporis et faciei (Infektion der lanugobehaarten Haut und des Gesichtes), Tinea unguium etc. Beim Befall der Nagelplatten von Hand- und Fußnägeln spricht man auch von Onychomykosen. Die von Dermatophyten verursachten Infektionen variieren in ihrer Ausprägung von mild verlaufenden bis zu sehr selten schwer verlaufenden Infektionen. Der Krankheitsverlauf ist hierbei abhängig von der Immunkompetenz des Wirtes auf Stoffwechselprodukte des Pilzes, der Virulenz des Stammes bzw. der Spezies, der anatomischen Lokalisation der Infektion sowie lokalen Umweltfaktoren (Weitzman und Summerbell 1995: 240). Das klinische Hauptproblem bei Dermatophytosen stellt allerdings weniger die Gefährlichkeit der Erkrankung durch besondere Krankheitschwere als vielmehr der oft chronische Verlauf mit möglichen daraus resultierenden Folgen dar. So ist besonders die Infektion der Nagelplatte durch Dermatophyten eine chronische Angelegenheit, da der ausgereifte Nagel keinen Anschluss an die Blutzirkulation hat und somit kein Kontakt zu Zellen der natürlichen Immunabwehr zustande kommen kann. Eine mögliche Selbstheilung des Organismus durch schnelleres distales Wachsen des Nagels als proximales Penetrieren durch den Dermatophyten ist äußerst selten, da meist ältere Menschen mit trophischen Störungen und damit einhergehendem verzögertem Nagelwachstum betroffen sind (Brasch 2010: 784).

Nach einer 2008 veröffentlichten Studie ist *T. rubrum* seit den 1950er Jahren der häufigste Erreger von Dermatophytosen in Deutschland sowie in Nord- und Zentraleuropa und ist für bis zu 90% der Dermatophytosen verantwortlich (Seebacher et al. 2008). Die Zielstrukturen von *T. rubrum* sind im Gegensatz zu manchen anderen Dermatophyten weniger die Haare oder Haarwurzeln, sondern vielmehr das Stratum corneum der Epidermis sowie das Nagelkeratin (Nenoff et al. 2014: 190). Hierbei macht sich *T. rubrum*

seine Keratinasen-Aktivität zu Nutze, um das feste Zytokeratin zu zersetzen und zu verwerten. Die höchste Aktivität dieser Keratinasen wird bei einem Temperaturbereich von 30-40°C und leicht alkalischem pH-Wert von 7-8 erreicht. Dieser Umstand und weitere Anpassungen führten dazu, dass *Trichophyton spp.* zu den anthropophilen Dermatophyten zählen. (Nenoff et al. 2014: 195).

Die wichtigsten Infektionswege für die Tinea pedis sowie die Onychomykose stellen allerdings weniger die direkte Übertragung von Mensch zu Mensch dar, sondern indirekte Übertragungen in geeigneten Umgebungen, wie im häuslichen Bad, Gemeinschaftsduchen und Umkleideräumen sowie in Hotels und Moscheen (Nenoff et al. 2012). Laut Nenoff et al. kommt es nur im Zusammenspiel einer Exposition gegenüber Dermatophyten und bestimmten Dispositionsfaktoren zum klinischen Bild der Tinea pedis oder auch der Onychomykose. Die Hauptdispositionsfaktoren stellen hierbei Durchblutungsstörungen der unteren Extremität, z.B. die chronisch venöse Insuffizienz, die peripher arterielle Verschlusskrankheit, aber auch Stoffwechselerkrankungen wie der Diabetes mellitus dar. Bei aktuell steigender Inzidenz und Prävalenz für trophische Störungen wie Diabetes mellitus (Scheidt-Nave et al. 2012) sowie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (Fowkes et al. 2013) deutschland- bzw. weltweit, ist davon auszugehen, dass die Inzidenz und Prävalenz der Tinea pedis und der Onychomykose ebenfalls in der Zukunft weiter steigen werden. Zudem haben Diabetiker mit Onychomykose ein 1,6 fach erhöhtes Risiko, im Verlauf ein diabetisches Fußsyndrom zu entwickeln (Boyko et al. 2006). Die Tinea pedis, insbesondere die interdigitale Form, bei der es zu Mazerationen im Zehenzwischenraum kommt, kann zudem als Eintrittspforte für bakterielle Erreger dienen und zum Erysipel führen (Hof und Dörries 2014: 477). Vor diesem Hintergrund sind geeignete Medikamente zur effektiven Therapie einer Dermatophytose, die nicht nur ein kosmetisches Problem darstellt, sondern weitere gesundheitliche Folgen nach sich ziehen kann, notwendig.

1.3 Antimykotische Therapie

Es gibt zwei Substanzgruppen, die gegen Pilze wirksam sind und unterschiedlich eingesetzt werden. Fungizide finden Anwendung außerhalb des menschlichen Körpers bspw.

auf Oberflächen als Desinfektionsmittel, Antimykotika hingegen kommen in der Therapie von Pilzinfektionen zum Einsatz. Die Gruppe der Antimykotika kann nach ihrer Wirkung auf die Pilzzelle weiter klassifiziert werden in fungistatische Substanzen, die die Vermehrung der Pilze hemmen und fungizide Substanzen, die zum direkten Absterben der Pilzzelle führen. Zudem können Antimykotika abhängig vom Applikationsweg in lokal bzw. topisch wirkende Medikamente sowie systemisch wirksame Medikamente unterteilt werden (Fritsche 2016: 291). Bei einer Einteilung der Antimykotika nach ihrem Wirkprinzip können verschiedene Gruppen unterschieden werden. Im Folgenden werden die relevantesten Gruppen und ihre Vertreter vorgestellt.

Die erste Gruppe wird gebildet von den „-Azolen“ wie Fluconazol, Itraconazol, Imidazol, Voriconazol und weiteren. Diese Wirkstoffe hemmen die Ergosterolsynthese der Plasmamembran der Pilzzelle. (Fritsche 2016: 292). Fluconazol hat beispielsweise eine hohe Spezifität für Cytochrom-P450-Enzyme der Pilzzelle bei gleichzeitig eher geringer Hemmung auf das menschliche CYP-450-Enzym. Trotzdem kann es zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen unter Fluconazol-Therapie kommen wie Übelkeit, Bauchschmerzen, Diarrhoe, Meteorismus und Hautausschlägen. Selten kommt es zu Beschwerden wie Haarausfall, Kopfschmerzen, Krämpfen und peripheren Nervenstörungen. Bei gleichzeitigem Vorliegen von AIDS oder einer malignen Erkrankung kann es gelegentlich zu Veränderungen hepatischer, renaler und hämatologischer Laborparameter kommen (Seebacher 2001: 101).

Die zweite Gruppe bilden die Polyen-Antimykotika, die zur Porenbildung in der Plasmamembran der Pilzzelle führen und unter Umständen auch toxisch auf menschliche Zellen wirken können. Vertreter dieser Gruppe sind z.B. Amphotericin, Nystatin und Natamycin.

In der dritten Gruppe finden sich Hemmstoffe der Zellwandsynthese der Pilzzelle, die Chitin als Angriffsziel haben. Klassische Vertreter dieser Gruppe der Echinocandine sind Caspofungin, Anidulafungin und Micafungin.

Die vierte Gruppe wird gebildet von dem Antimykotikum 5-Fluorcytosin. Dieser Hemmstoff wird von der Pilzzelle fälschlicherweise in der DNA-Synthese anstelle des Bausteins Cytosin eingebaut und führt schließlich zu Fehlern in der Transkription. 5-Fluorcytosin

wirkt fungistatisch und ausschließlich auf die Pilzzelle, allerdings wird es wegen der Gefahr der Resistenzbildung oft kombiniert mit Amphotericin eingesetzt.

Eine weitere Gruppe bilden die Allylamine mit den Vertretern Naftifin und Terbinafin. Diese Wirkstoffe führen zur Anhäufung einer Vorstufe des Ergosterols und blockieren so zum einen die Ergosterinsynthese und führen zum anderen durch die Anhäufung der für die Pilzzelle toxisch wirkenden Vorstufe zum Absterben des Pilzes.

In die Gruppe der Pyridone fallen Ciclopirox und Ciclopiroxolamin, die durch Enzymhemmung der Pilzzelle antimykotisch wirken (Fritsche 2016: 292; Hof 2003: 114).

Die meisten verwendeten Substanzen greifen hemmend in die Synthese des Ergosterins der Pilzzelle ein. Dieses Target ist sehr attraktiv, da Ergosterin nur von Pilzen gebildet wird und nahezu alle Pilze Ergosterin synthetisieren. Es stellt einen wichtigen Baustein der Zellwand dar, daher hat eine Störung dieser Synthese weitreichende, meist zum Zelltod führende Konsequenzen für die Pilzzelle. Zudem können Antimykotika wie Griseofulvin und Ciclopiroxolamin, die ihre antimykotische Wirkung außerhalb der Ergosterolsynthese entfalten in Kombination mit Ergosterolsynthesehemmern zu synergistischen Therapieeffekten führen (Hof 2003: 102; Plewig et al. 2018: 267–268).

Resistenzmechanismen der Myceten gegenüber den antimykotischen Wirkstoffen sind vor allem a priori oder nach Mutation entstandene erhöhte Permeabilitätsbarrieren. Diese Barriere kann entweder durch eine besonders dichte Zellwand oder aber durch Effluxpumpen vermittelt werden, die in die Zelle eingedrungene Wirkstoffe direkt wieder ausschleusen. Aktuell haben Resistenzen in der antimykotischen Therapie noch nicht den gleichen Stellenwert wie in der antibiotischen Therapie. Allerdings ist eine zielgerichtete Therapie von Pilzinfektionen durch die Ähnlichkeit der Pilzzelle zur eukaryoten Zelle im Vergleich zur prokaryoten Zelle der Bakterien schwieriger, weshalb eine deutlich kleinere Anzahl an Antimykotikaklassen als Antibiotikaklassen zur Therapie zur Verfügung steht (Hof 2003: 105; Seifert 2018: 418).

Nach den Leitlinien von der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft zur Therapie der Tinea der freien Haut ist zunächst eine topische Therapie indiziert und erst bei Versagen der Lokaltherapie kommt eine systemische Therapie in Betracht. Die Fachgesellschaften empfehlen zur lokalen

Therapie die folgenden Substanzen: Azole, Hydroxypyridone, Allylamine und Morpholine. Die Auswahl der Substanzen richtet sich hierbei nach Lokalisation und Ausprägung der Dermatophytose und kann auch eine Kombination mehrerer Substanzklassen beinhalten. Die verschiedenen Wirkstoffe sind als Cremes, Lösungen, Gels, Pasten oder auch Puder erhältlich. Da die meisten Antimykotika auf die Ergosterolsynthese wirken und somit keine ruhenden Pilzelemente ohne aktive Zellmembransynthese erreichen, wird empfohlen die Behandlungsdauer ca. 3-4 Wochen über die klinische Heilung hinaus fortzusetzen. Ausnahmen hiervon bilden Ciclopiroxolamin und Terbinafin in hohen Konzentrationen. Verschiedene Studien legen nahe, dass Terbinafin bereits nach siebentägiger topischer Anwendung zu einer Heilung von *Tinea pedis interdigitalis* führen kann (Schmid-Wendtner und Korting 2008). Kommt es allerdings zum Versagen der topischen Therapie, ist eine systemische Therapie angezeigt. In diesen Fällen empfehlen die dermatologischen Fachgesellschaften als Substanzen: Griseofulvin, Azole und Terbinafin.

Laut Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft zur Therapie der Onychomykose kommen grundsätzlich die gleichen Substanzgruppen wie in der Therapie der *Tinea* der freien Haut zum Einsatz. Allerdings wird der lokale Therapieversuch mittels Nagellacken nur für die Form der *Leukonychia trichophytica* und der distolateralen subungualen Onychomykose ohne Befall der Nagelmatrix empfohlen. Alle weiteren Formen sollten direkt systemisch therapiert werden. Die Therapie der Onychomykose ist sehr langwierig und kann bis zu 12 Monate und mehr andauern, dies liegt an der in Kapitel 1.2 bereits beschriebenen speziellen Lokalisation mit fehlendem Anschluss zur Blutzirkulation. Eine initial atraumatische Nagelentfernung mittels Kalium iodatum oder Urea in Salbenform führt zu deutlich verbesserten Behandlungsergebnissen. Die Probleme bei der Therapie der Onychomykose stellen laut Leitlinie zur Onychomykose der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft v.a. die ruhenden Arthrosporen dar, die zu eingeschränkten Heilungsraten und hohen Rezidivquoten führen. Zudem ist bei dieser langwierigen Therapie über viele Monate mit z.T. täglicher Tabletteneinnahme eine hohe Compliance der Patienten notwendig. Und schließlich kann es gerade im Rahmen dieser langen Therapiedauer zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen oder aber zu Interaktionen mit anderen Medikamenten kommen, wenn beispielsweise Fluconazol

eingesetzt wird, das CYP-3A4 hemmt und so den Wirkspiegel weiterer Medikamente erhöht, die über CYP-3A4 abgebaut werden (Seifert 2018: 423).

1.4 Curcumin

Curcumin ist ein Bestandteil des Rhizoms (Wurzelstock) der Pflanze *Curcuma longa*, welche zur Gattung der *Zingiberaceae* (Ingwergewächse) gehört. Das pulverisierte Rhizom wird auch Kurkuma oder Gelbwurzel genannt. Es konnten bereits über 100 Bestandteile des Rhizoms isoliert werden. Die Hauptkomponenten der Wurzel sind flüchtige Öle und das farbgebende Curcumin sowie Curcuminoiden (Demethoxycurcumin, 5-Methoxycurcumin und 1,2-Dihydrocurcumin), welche 5-7% des Rhizoms ausmachen. *Curcuma longa* wird vor allem in südöstlichen Teilen Asiens kultiviert und das Rhizom wird in der ayurvedischen Kultur bereits seit einigen tausend Jahren zum Würzen von Speisen, Färben und zu medizinischen Zwecken eingesetzt (Prasad und Aggarwal 2011; Ravindran 2007: 298). In der ayurvedischen Medizin wird Kurkuma bzw. seine biologisch aktive Komponente Curcumin u.a. eingesetzt zur Linderung von respiratorischen Beschwerden wie Asthma bronchiale und bei Allergien sowie bei Rheuma, Lebererkrankungen, diabetischen Wunden und Erkältungserscheinungen. Auch im Bereich TCM (Traditionelle Chinesische Medizin) findet Kurkuma Anwendung, um beispielsweise Bauchschmerzen zu behandeln. Die vielfältigen medizinisch nutzbaren Effekte von Kurkuma wurden im Rahmen von *in vitro*-, *in vivo*- und klinischen Studien untersucht. Zu den beobachteten Eigenschaften des Curcuma gehören antibakterielle, antivirale, antifungale, antientzündliche, antioxidative und antiseptische (Prasad und Aggarwal 2011). Diese Wirkungen entfaltet Kurkuma überwiegend mittels seiner Komponente Curcumin, das über eine Interaktion mit NF- κ B sowie der Inhibition verschiedener Kinasen und Enzyme wie der Cyclooxygenase, der Lipooxygenase und Zytokinen wie IL-6, IL-8 sowie NF- α antientzündlich sowie antineoplastisch wirkt (Priyadarsini 2013: 2093). Die OH-Gruppen der Phenole des Curcumins spielen eine wichtige Rolle als Radikalfänger und sind verantwortlich für die antioxidative Wirkung, während die alpha-, beta- Keto-Enol-Strukturen des Curcumins mit der antitumorösen Wirkung assoziiert sind (Priyadarsini 2013: 2098). Den diversen positiven Effekten des Curcuma stehen bisher keine beobachteten toxischen Effekte auf

Menschen oder Tiere gegenüber, sodass die FDA (Food and Drug Administration) Kurkuma bzw. seine biologisch aktive Komponente Curcumin als generell sicher einstuft (Prasad und Aggarwal 2011).

Eine Schwierigkeit bei der Nutzung von Curcumin zu therapeutischen Zwecken besteht in seiner schlechten Bioverfügbarkeit, die einer mäßigen Absorption im Gastrointestinal-Trakt sowie einem schnellen Metabolismus als auch einer raschen Elimination geschuldet ist. Es gibt bereits einige Studien, in denen praktikable Ansätze zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Curcumin untersucht wurden (Vaughn et al. 2016: 1261). Dies betrifft die Formulierung/Galenik des Curcumins, welches u.a. in Form von Pulver, liposomal, in Nanopartikeln, mittels Lipopolysaccharid-Transporter oder in Phospholipidkomplexen eingesetzt wurde (Chaurasia et al. 2015: 14; Du et al. 2016; Duse et al. 2018; Sanoj Rejinold et al. 2011). Chaurasia et al. konnten beispielsweise zeigen, dass Curcumin gebunden an einen Lipopolysaccharid-Transporter, nach oraler Aufnahme in über 100-facher Plasmakonzentration im Vergleich zu purem Curcumin nach oraler Aufnahme vorlag. Ebenso untersuchten Schiborr et al. (Schiborr et al. 2014) die Bioverfügbarkeit von Curcumin nach oraler Gabe in Form von Pulver, in mikronisierter Form sowie in micellierter Form und konnten eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit um mind. das 185-fache durch das micellierte Curcumin im Vergleich zum Curcumin in Pulverform beobachten. Unerwünschte Effekte auf das Wohlbefinden der Probanden reichten von milder Übelkeit bis zu Veränderungen des Stuhls, allerdings nahmen lediglich 23 Probanden an dieser Studie teil, daher ist keine valide Aussage über die Häufigkeit möglicher Nebenwirkungen zu treffen. Es kann aber festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Studie keine schwerwiegenden Symptome nach oraler Aufnahme auftraten.

Zudem wurden Adjuvantien untersucht, welche die Wirkung des Curcumins erhöhen sollten, indem metabolische Ab- und Umbauprozesse inhibiert werden, wie beispielsweise Piperin (ein Extrakt aus schwarzem Pfeffer) oder auch Fett (Vaughn et al. 2016: 1261). Shoba et al. (Shoba et al. 1998) konnten in einer *in vivo* Untersuchung eine signifikante Steigerung der Plasmakonzentration des Curcumins feststellen, wenn dieses in Kombination mit Piperin eingenommen wurde, im Vergleich zur Einnahme des Curcumins ohne Piperin. Piperin ist ein Inhibitor der hepatischen und intestinalen Glucuronidierung und verhindert somit die Inaktivierung des Curcumins durch eine Umwand-

lung in einen weniger wirksamen Metaboliten (Anand et al. 2007). In der folgenden Arbeit wird erstmals eine micellierte Curcuminformulierung gegenüber in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöstem Curcumin hinsichtlich ihrer fungiziden bzw. fungistatischen Wirkung auf *T. rubrum in vitro* untersucht.

($1E,6E$)- $1,7$ -Bis-(4 -hydroxy- 3 -methoxyphenyl)-hepta- $1,6$ -dien- $3,5$ -dion

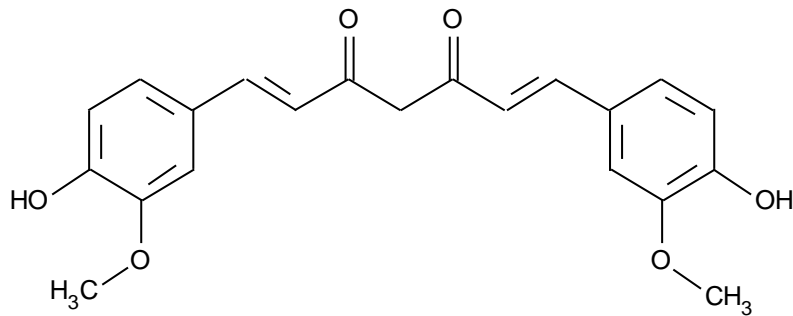


Abbildung 1: Summen- und Strukturformel von Curcumin

1.5 DMSO (Dimethylsulfoxid)

Dimethylsulfoxid ist ein protonenfreies Lösungsmittel, das selbst eine sehr hohe Wasserlöslichkeit besitzt und eingesetzt werden kann, um hydrophobe Stoffe zu lösen. Die Toxizität von DMSO ist als gering einzuschätzen. Eher besteht eine Gefahr bei der Kombination von DMSO mit toxischen Substanzen, da DMSO als Penetrationsvermittler biologischer Membranen fungiert und so beispielsweise das Durchdringen schädigender Stoffe durch die Haut erhöhen kann (Brayton 1986: 61). Kolb et al. konnten in einer *in vivo* Studie fünf Minuten nach kutaner Applikation von radioaktiv markiertem DMSO dieses im Blut nachweisen, nach 60 Minuten konnte DMSO in den Knochen detektiert werden (Kolb et al. 1967: 85–87). Weiterhin wurde nach topischer Applikation von DMSO ein foetor ex ore beobachtet, der durch den Metaboliten DMS (Dimethylsulfid) hervorgerufen wird. Zudem wurden eine schnellere Heilung von Verbrennungen und eine Reduktion von Schmerzen und Schwellung nach Dimethylsulfoxid Applikation beobachtet (Brayton 1986: 64). In einigen Studien wurde DMSO als Antidot zur topischen Therapie bei Zustand nach Extravasation von Chemotherapeutika eingesetzt und hierbei

wurden unerwünschte Effekte beobachtet wie ein brennendes Hautgefühl, Jucken, Rötung und oberflächliche Schuppung der Haut (Olver et al. 1988: 1733). Sehr selten wurden Einzelfälle beobachtet, in denen es unter topischer Dimethylsulfoxid Gabe zu Analgetika-refraktären Schmerzen kam (Llinares et al. 2005).

1.6 Optische Strahlung

Optische Strahlung wird abhängig vom Wellenlängenbereich eingeteilt. Die geringste Wellenlänge zeigt UV-C Strahlung mit Wellenlängen unter 280nm. UV-C Strahlung wird vollständig von der Stratosphäre absorbiert. Die weitere Einteilung der optischen Strahlung erfolgt in UV-B Strahlung (Wellenlängenbereich 280nm-320nm), UV-A Strahlung (Wellenlängenbereich 320nm-400nm), sichtbares Licht (Wellenlängenbereich 400nm-700nm) und schließlich Infrarotstrahlung (Wellenlängenbereich über 700nm). Die Photonenenergie optischer Strahlung nimmt mit steigender Wellenlänge ab, während die Eindringtiefe in den menschlichen Organismus mit steigender Wellenlänge zunimmt. Entsprechend ist die Eindringtiefe der UV-B Strahlung gegenüber UV-A Strahlung und sichtbarem Licht deutlich geringer. So gelangen nur ca. 15% der UV-B Strahlung in die Dermis, bei UV-A Strahlung gelangen ca. 60% bis in die Dermis und 1% bis in die Subkutis. Sichtbares Licht dringt mit bis zu 80% in die Dermis ein und bis zu 20% gelangen in die Subkutis (Berneburg und Schwarz 2013: 342; Meffert und Meffert 2000: 99–100). Wenn Licht oder UV-Strahlung auf menschliche Haut trifft, wird ein Teil der Photonen an der Haut reflektiert und gestreut, die restlichen Photonen werden von der Haut absorbiert und auf Chromophore (absorbierende Verbindungen) übertragen (Mahmoud et al. 2008). Chromophore von blauem Licht sind u.a. Porphyrine, Hämoprotein, Flavine, Karotinoide und Bilirubin. Der physikalische Vorgang der Absorption von Photonen und der damit einhergehende Energietransfer werden als Primärreaktion bezeichnet, während der darauffolgende chemische Vorgang mit Bildung freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies als Sekundärergebnis bezeichnet wird. Diese Prozesse laufen innerhalb von Sekunden ab. Die potentiell folgenden biologischen Prozesse wie Entzündung, Pigmentierung und auch therapeutische Effekte zeigen sich hingegen nach Stunden bis Tagen. Pathologische Spätreaktionen wie durch optische Strahlung induzierter Hautkrebs oder Hautalterung stellen sich erst nach Jahren bis Jahrzehnten dar (Meffert und Meffert

2000: 99–100). Aufgrund der hohen Quantenenergie der UV-Strahlung sind die Auswirkungen auf den Menschen schwerwiegender als die Auswirkungen des sichtbaren Lichtes und der Infrarotstrahlung. UV-Strahlung führt abhängig von der Dosis zu Sonnenbrand, Hautalterung und maligner Entartung. Die Effekte des sichtbaren Lichtes auf menschliche Haut sind weniger schwerwiegend, allerdings sind sie auch deutlich weniger in Studien untersucht und nicht so umfassend verstanden wie die Effekte der UV-Strahlung (Meffert und Meffert 2000: 99–100).

Kleinpenning (Kleinpenning et al. 2010) untersuchte in einer klinischen Studie histologisch Hautbiopsate nach erfolgter Bestrahlung mit blauem Licht, um eventuelle durch die Bestrahlung induzierte Schäden der Haut nachweisen zu können. In der Untersuchung konnten weder Schäden der DNS noch Hinweise auf eine verstärkte Hautalterung, wie sie bei UV-A Strahlung auftritt, nachgewiesen werden. Die histologischen Proben zeigten nach Bestrahlung mit blauem Licht eine Hyperpigmentation sowie einen Anstieg der Melan-A-positiven Zellen. Vermehrte Apoptose oder p53 Expression wurden nach Bestrahlung mit blauem Licht nicht festgestellt. Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Untersuchung von Duteil et al. im Jahr 2014, in der klinischen Studie wurde an gesunden Probanden die klinischen und histologischen Effekte von einer Bestrahlung mit blauem Licht mit der Wellenlänge 415nm, rotem Licht mit der Wellenlänge 630nm sowie von UV-B Licht untersucht. Die Bestrahlung mit blauem Licht führte dosisabhängig zu einer Hyperpigmentation der Haut, die ca. 3 Monate anhielt. Histologische Untersuchungen der bestrahlten Hautpartien zeigten zudem eine signifikante Erhöhung von nekrotischen Keratinozyten sowie dem Molekül p53 unter UV-B Strahlung gegenüber der Bestrahlung mit blauem und rotem Licht (Duteil et al. 2014). Liebmann et al. untersuchten die Effekte von sichtbarem Licht unterschiedlicher Wellenlängen auf menschliche Endothelzellen und Keratinozyten *in vitro*. In dieser Untersuchungsreihe zeigten sich bei Bestrahlung der Wellenlänge 630-940nm keine toxischen Effekten auf die Zellen. Demgegenüber konnten nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 412-426nm ab Lichtdosen von $66\text{J}/\text{cm}^2$ dosisabhängig zytotoxische Effekte im Sinne reduzierter Lebensfähigkeit der Zellen sowie reduzierter Proliferationsraten beobachtet werden. Hierbei zeigten sich die Endothelzellen empfindlicher für die toxische Schädigung als die Keratinozyten (Liebmann et al. 2010).

1.7 Photodynamische Therapie

Aufgrund der aktuell immer noch unbefriedigenden Ergebnisse in der Therapie der global weit verbreiteten Tinea und v.a. der Onychomykose sind neue Ansätze in der Therapie der Dermatophytosen von hohem medizinischem Interesse. Zur Zeit sind neue Ansätze mit dem Ziel der effizienteren und nebenwirkungsärmeren Wirkweise in der Therapie der Dermatophytose in Erprobung: Laser, Iontophorese, Ultraschall und schließlich die Photodynamische Therapie (Gupta und Simpson 2012).

Die Anfänge der Photodynamische Therapie (PDT) reichen zurück bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts (Gold 2011: 1). Das Grundprinzip der PDT besteht in der Gabe eines Photosensibilisators und dessen Aktivierung durch die Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge. Die durch das Licht induzierte Aktivierung des Photosensibilisators (PS) stellt sich in chemischen Reaktionen vom Typ 1 und Typ 2 dar. In der Typ 1 Reaktion kommt es zum Elektronentransfer und der Entstehung von reaktiven Radikalen wie Superoxiden und Wasserstoffperoxid, diese wiederum gehen Reaktionen mit weiteren Molekülen ein und führen so zu Zellschäden. In der Typ 2 Reaktion kommt es durch die Reaktion mit Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff. Dieser ist ein kurzlebiges, reaktives Teilchen, das Reaktionen mit elektronenreichen Molekülen eingeht und so ebenfalls zu Schaden führt. Sowohl die Typ 1 als auch die Typ 2 Reaktionen führen letztlich zum Zelltod als Resultat der Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies. Welche der beiden Reaktionen hauptsächlich abläuft, ist von äußeren Faktoren wie bspw. der Sauerstoffkonzentration des Gewebes abhängig (Smijs und Pavel 2011: 5).

Mittlerweile sind diverse Substanzen bekannt, die als Photosensibilisatoren fungieren können und diese finden in vielen Bereichen der Dermatologie Anwendung (Gold 2011: 2).

Die bisherigen Studien zur Untersuchung der PDT als Wachstumsinhibitor bei Dermatophytosen wurden hauptsächlich mit 5-Aminolävulinsäure (ALA) als PS und mit Rotlicht durchgeführt. Die *in vitro* und *ex vivo* Ergebnisse dieser Studien waren sehr vielversprechend, da sich die Arthrokonidien von *T. rubrum* als besonders empfänglich für die PDT zeigten, also diejenigen Pilzelemente, bei denen die meisten Antimykotika in ihrer Wirkung versagen (Smijs und Pavel 2011: 7).

Die Bindungsaffinität des PS an die Zellwand der Dermatophyten wird maßgeblich durch die elektrische Ladung dieser beiden bestimmt. Da die äußere Oberfläche der Pilzzelle meist negativ geladen ist, können positiv geladene PS eine stärkere Bindung mit der Pilzzelle eingehen. Die PS müssen nicht zwangsläufig die Zellwand der Dermatophyten durchdringen, um ihre antimykotische Wirkung zu entfalten. Die als PS eingesetzten Porphyrine bspw. sind zu groß, um die Pilzzelle zu penetrieren und üben ihre Effekte auf die Pilzzelle ausschließlich von außen aus (Smijs und Pavel 2011: 5).

Laut aktueller S1-Leitlinie zur UV-Phototherapie und Photochemotherapie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft sind absolute Kontraindikationen für diese Therapien das Vorliegen von Gendefekten, die zu erhöhter Lichtempfindlichkeit und zu einem erhöhten Hautkrebsrisiko führen, z.B. Xeroderma pigmentosum. Relative Kontraindikationen, die besonders engmaschige Kontrollen oder eine Modifizierung der Behandlungsschemata erfordern, sind das Vorliegen von Krampfleiden oder malignen Hauttumoren in der Vorgeschichte.

1.8 Antimykotische Therapie mit Curcumin und Licht

Seit dem Jahr 2000 ist ein Anstieg des Einsatzes der PDT im Rahmen von Hautinfektionen zu beobachten. Das Interesse an diesem Gebiet ist vor allem steigenden Resistenzen gegen etablierte Antibiotika und auch Antimykotika geschuldet, die langfristig nach Behandlungsalternativen verlangen (Smijs und Pavel 2011: 2).

Mittlerweile gibt es mehrere Studien, in denen die Effekte von Curcumin auf das Wachstum verschiedener Pilzarten genauer untersucht wurden. Im Folgenden werden einige Studien genannt, in denen Curcumin in diesem Rahmen bereits als Photosensibilisator eingesetzt wurde.

Dovigo et al. (Dovigo et al. 2011) untersuchten die photodynamischen Effekte von Curcumin auf *C. albicans*. In der *in vitro* Untersuchung konnte bei Zugabe von Curcumin in den Konzentrationen 7,4 mg/l, 3,7 mg/l sowie 1,8 mg/l und einer Bestrahlung mit 37,5 J/cm² bei einer Wellenlänge von 440-460 nm eine signifikante Wachstumsinhibierung gegenüber den Kontrolleinheiten ohne anschließende Bestrahlung bzw. ohne Behandlung mit Curcumin auf *C. albicans* beobachtet werden.

Baltazar et al. (Baltazar et al. 2015) konnten bereits zeigen, dass Curcumin in einer Dosierung von $10\mu\text{g/ml}$ in Kombination mit Bestrahlung von Licht der Wellenlänge 420nm und einer Bestrahlungsintensität von 10 J/cm^2 *in vitro* zur Apoptose von *T. rubrum* via Induktion von reaktivem Sauerstoff und Stickstoffverbindungen führt, während eine Behandlung mit Curcumin ohne anschließende Bestrahlung im Rahmen dieser Untersuchung nicht zu einer Wachstumshemmung des Dermatophyten führte.

Al-Asmari et al. (Al-Asmari et al. 2017) untersuchten Curcumin in Propylenglykol und Aqua destillata gelöst in einer *in vitro* Versuchsreihe auf seine wachstumshemmende Wirkung auf *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans* und *Zygosaccharomyces bailii*. In dieser Untersuchungsreihe wurde das Curcumin ebenfalls photodynamisch mit Licht der Wellenlänge 420 nm aktiviert und eine Lichtdosis von 0 bis 96 J/cm^2 eingesetzt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion des Pilzwachstums zwischen bestrahltem und unbestrahltem Ansatz. Dieser Effekt der Wachstumshemmung des photoaktivierten Curcumins war dosisabhängig und variierte abhängig von der Pilzart. Die Unterschiede in der Wachstumsinhibition zwischen der niedrigsten Lichtdosis von 24 J/cm^2 und der höchsten Lichtdosis von 96 J/cm^2 waren hingegen zu vernachlässigen. Eine Erhöhung der Lichtdosis über 24 J/cm^2 erbrachte keine signifikante Steigerung der Wachstumshemmung.

Ebenso konnten Brasch et al. (Brasch et al. 2017) einen signifikanten, wachstumshemmenden Effekt von photodynamisch aktiviertem Curcumin, gelöst in DMSO und Phosphatpuffer, auf verschiedene Dermatophytenarten beobachten. In dieser Versuchsreihe wurde UV-A Strahlung der Wellenlänge 367nm eingesetzt.

1.9 Fragestellung

Nachdem der wachstumshemmende Effekt von Curcumin gelöst in DMSO auf Dermatophyten bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, ob Curcumin in micellierter Form ähnliche oder gleiche Effekte bei geringerer Konzentration ausüben kann. Dies näher zu untersuchen, war die zentrale Fragestellung dieser Arbeit.

Damit schließt sich diese Untersuchung der Arbeit von Brasch et al. (Brasch et al. 2017) an, in der bereits gezeigt werden konnte, dass Curcumin aufbereitet mit DMSO und aktiviert durch UV-A-Licht der Wellenlänge 367 nm auf verschiedene Dermatophytenarten einen wachstumshemmenden Effekt hat. Spezielle Zielsetzung meiner Arbeit war es, weitere Erkenntnisse bezüglich der Curcuminwirkung auf Dermatophyten zu gewinnen. So sollte vor allem eine bisher nicht untersuchte Curcuminformulierung in micellierter Form im Vergleich zu dem in DMSO gelösten Curcumin eingesetzt werden, um deren Effekte auf die Wachstumshemmung miteinander zu vergleichen. Desweiteren wurden als Wachstumseinheiten jeweils Konidien sowie Myzel der Dermatophyten verwendet und hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit bezüglich der antimykotischen Wirkung des Curcumins verglichen. Dabei kam eine Lichtquelle zum Einsatz, die sichtbares blaues Licht der Wellenlänge 420 nm emittierte.

Letztlich sollen diese Untersuchungen als Grundlage dafür dienen, eine für medizinisch-therapeutische Zwecke einsetzbare Photochemotherapie gegen Dermatophyteninfektionen zu entwickeln, die der Wirksamkeit etablierter Antimykotika nicht unterlegen ist, allerdings weniger unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen verursacht und damit einen relevanten Vorteil für Patienten darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchskonzept

Die Untersuchung wurde ausschließlich mit *T. rubrum* durchgeführt, der in Deutschland der häufigste Dermatophyt ist und beim Menschen vor allem das Keratin im Bereich des Stratum Corneum der Epidermis oder das Nagelkeratin befällt (Mügge et al. 2006).

Die Versuche erfolgten unter Verwendung von 96-Well Mikrotiterplatten (96 well, FALCON, Corning Incorporated, New York, USA) deren Kavitäten mit Konidien bzw. Myzel beschickt wurden. Im Anschluss wurde den Kavitäten Curcumin in vier unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und es erfolgte nach 20-minütiger Dunkelinkubation eine Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 420 nm und einer Energie von 20 J/cm². Ein Ansatz wurde jeweils zur Kontrolle unbestrahlt belassen. Das Wachstum der Dermatophyten wurde über einen Zeitraum von 9 Tagen beobachtet und es erfolgten in dieser Zeit insgesamt 7 Messungen. Über diesen Zeitraum wurden die Dermatophyten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Wachstumskontrolle erfolgte qualitativ durch lichtmikroskopische Analysen sowie quantitativ über photometrische Extinktionsmessungen der beschickten Mikrotiterplatten.

Abschließend erfolgte eine bakteriologische Kontrolle, um eventuelle Verunreinigungen und damit potentielle Verfälschungen der Messergebnisse ausschließen zu können.

2.2 Dermatophyten

Es wurden 5 Stämme von *T. rubrum* für die Versuche verwendet, von denen jeweils Konidien und Myzel gewonnen wurde. Die Stämme wurden hierfür aus der Mykothek der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des UKSH, Campus Kiel entnommen. Alle Stämme waren aus Tineaherden von Patienten isoliert worden, angezüchtet und wurden anschließend anhand speziestypischer morphologischer Kriterien (Hoog et al. 2000) und mittels genetischer Analysen (Mentype® MycoDerm^{QS} Lateral Flow test; Biotype Diagnostic GmbH, Dresden, Deutschland) identifiziert. Die ausgewählten

Stämme zeichneten sich durch eine reichliche Konidienbildung aus und waren daher gut für die *in vitro* Untersuchungen geeignet.

Die Stämme haben folgende Labornummern:

1: 423, 2:472, 3:503, 4:515, 5:521.

2.3 Gewinnung der Konidien und des Myzels

Das Anzüchten der Dermatophyten erfolgte initial auf Sabouraud Glucose Agarplatten (DERMATOPHYTES-AGAR, Graso Biotech, Jablowo, Polen). Deren Beimpfung wurde entweder mit einem über dem Bunsenbrenner ausgeglühten Platindraht oder Einmalimpfösen (ImpfSchlinge, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurden die Platten im Brutschrank bei durchschnittlich 26°C inkubiert, bis sich makroskopisch genügend Myzel und Konidien für die Versuchsreihe gebildet hatte, was nach 14 Tagen der Fall war.

Von diesen Platten wurden sodann Konidien und Myzelfragmente für die Versuche gewonnen. Für die Konidien- sowie die Myzelgewinnung wurden die Agarplatten zunächst mit Phosphat-Puffer mit dem pH-Wert 5,5 (MERCK, Darmstadt, Deutschland) geschwemmt. Abgelöstes Myzel und Konidien konnte dann in Suspension mit Einmalpipetten (Transferpipette, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) abgezogen werden und in sterile 50 ml Gefäße (CELLSTAR®TUBES, greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) überführt werden. Um bei dieser Methode verbleibende Agarreste zu entfernen, wurden die gewonnenen Dermatophyten-Puffer-Suspensionen insgesamt dreimal bei Raumtemperatur mit 3500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Megafuge®1.OR, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland). Der Überstand wurde anschließend verworfen und der Bodensatz aus Pilzmaterial mit Phosphat-Puffer wieder aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, sodass verbliebene Agarreste nahezu vollständig entfernt wurden, was abschließend auch mikroskopisch (Lichtmikroskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) kontrolliert wurde.

Im weiteren Verlauf unterschieden sich die Schritte in der Materialgewinnung der Konidien und des Myzels.

Die Suspensionen, aus denen Konidien gewonnen werden sollten, wurden mehrfach mit sterilen Mullbinden (Mullkompressen BEESANA, Karl Beese GmbH & Co. KG, Barsbüttel, Deutschland) filtriert, um Myzelbestandteile zu entfernen. Der Filtriervorgang lief schrittweise ab und zwischenzeitlich wurde das Material mikroskopisch untersucht, um sicherzustellen, dass zum einen hauptsächlich Konidien und kein Myzel mehr vorhanden war und zum anderen nicht zu viel Material durch die Filtervorgänge verloren ging. Schließlich wurde von jedem Stamm eine Konidiensuspension mit der Konzentration 2×10^5 Konidien/ml hergestellt, indem die Konidien-Puffer-Lösung mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer auf ihre Konidienkonzentration hin untersucht werden konnte und mit entsprechenden Verdünnungsschritten auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden konnte.

Die Suspensionen, aus denen Myzelfragmente gewonnen werden sollten, wurden nicht filtriert, sondern in sterile 2 ml Röhrchen mit Glas-bzw. Stahlbeads (Lysis Tubes J, analytik jena, Jena, Deutschland) pipettiert und anschließend in einem Homogenisator (Speed Mill Plus, analytik jena, Jena, Deutschland) drei Mal je zwei Minuten homogenisiert. Danach wurde das makroskopisch homogen zerkleinerte Material wieder in 50 ml Gefäße pipettiert und mit Puffer aufgefüllt.

Um identische Ausgangsbedingungen für die photometrischen Messungen zu schaffen, mussten die Konidien- und die Myzelsuspensionen in ihrer optischen Dichte angeglichen werden.

Die mit dem Photometer (Sunrise Remote™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmte optische Dichte der Konidiensuspension diente hierbei als Zielwert für die optische Dichte der Myzelsuspension. So wurde über Verdünnungsreihen der Myzelsuspension und anschließende photometrische Messungen das Verhältnis von Myzelfragmenten und Puffer ermittelt, das in seiner optischen Dichte der optischen Dichte der Konidiensuspension entsprach.

2.4 Herstellung der Curcuminlösungen

Es wurde sowohl micelliertes Curcumin (NovaSol® Curcumin, AQUA NOVA AG, Darmstadt, Deutschland) verwendet als auch Curcumin in Pulverform (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), das in DMSO und Puffer gelöst wurde. Es wurden von beiden Curcuminlösungen Stammlösungen in gleicher Curcuminkonzentration angesetzt, aus denen dann jeweils die eingesetzten verschiedenen Curcuminkonzentrationen hergestellt wurden.

Für die Herstellung der Curcuminlösung in DMSO wurden zunächst 10 mg Curcuminpulver (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in einem sterilen Erlenmeyerkolben eingewogen. Diesem Erlenmeyerkolben wurden anschließend 20 ml DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) zugefügt, sodass das Curcumin in 20 ml DMSO gelöst vorlag.

Parallel wurden 480 ml Phosphat-Puffer in einem sterilen Gefäß auf einem Magnetrührer mit integrierter Wärmeplatte (RET IKAMAG®, IKA-Werte GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland) bis zu einer Temperatur von 100°C erwärmt. Nach Erreichen der Temperatur wurde die Curcumin-DMSO-Lösung in den Phosphat-Puffer titriert und so lange mit dem Magnetrührer unter konstanter Temperatur von 100°C gerührt, bis die nun entstandene Curcumin Stammlösung schließlich klar wurde und das Curcumin sich vollständig gelöst hatte.

Bei dieser Curcuminkonzentration der Stammlösung blieb auch nach Temperaturabfall das Curcumin in Lösung.

Für die Herstellung der micellierten Curcuminstammlösung wurden zunächst 2 ml micelliertes Curcumin (NovaSol® Curcumin, AQUA NOVA AG, Darmstadt, Deutschland) in ein Eppendorf Gefäß (Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert und auf 56°C erwärmt, da dies später zu einer verbesserten Löslichkeit des Curcumins in dem Phosphat-Puffer führte. Anschließend wurde über mehrschrittige Verdünnungen zunächst die Stammlösung aus micelliertem Curcumin und Phosphat-Puffer hergestellt. Auch hierbei kam es nach Temperaturabfall nicht zu einem Ausfall des Curcumins.

Nachdem von beiden Curcuminformen Stammlösungen mit jeweils einer Konzentration von 20 mg Curcumin/l hergestellt wurden, konnten in weiteren Verdünnungsschritten folgende Curcuminkonzentrationen hergestellt werden: 10 mg Curcumin/l, 5 mg Curcumin/l und 2,5 mg Curcumin/l. Diese vier unterschiedlich konzentrierten Lösungen wurden, wie im Abschnitt „Versuchsaufbau“ beschrieben, durch Zugabe weiterer Substanzen in die Mikrotiterplatte um den Faktor 4 verdünnt. Die eingesetzten Endkonzentrationen in der Mikrotiterplatte werden wie folgt bezeichnet:

"Cur 1" entspricht einer Curcuminkonzentrationen von 5 mg/l, "Cur 2" entspricht einer Curcuminkonzentrationen von 2,5 mg/l, "Cur 3" entspricht einer Curcuminkonzentrationen von 1,75 mg/l und "Cur 4" entspricht einer Curcuminkonzentrationen von 0,625 mg/l. Die unterschiedlichen Lösungsbezeichnungen werden jeweils mit dem Postfix "/DMSO" (für die Lösung in DMSO und Puffer) oder "/micelliert" (für das micellierte Curcumin) versehen.

Während der Herstellung der Curcuminlösungen wurde strikt auf möglichst geringe Lichtexposition des Curcumins geachtet.

2.5 Belichtungsaufbau

Das Absorptionsmaximum von Licht liegt bei Curcumin im Wellenlängenbereich von 430 nm (Al-Asmari et al. 2017: 302). Um in der hier erfolgten Versuchsreihe eine größtmögliche Photoaktivierung des Curcumins zu ermöglichen, wurde mit einer eigens dafür konstruierten LED-Lampe gearbeitet, die Licht der Wellenlänge 420 nm emittiert, also sehr nah am Absorptionsmaximum des Curcumins. Die Leuchtdioden der Bestrahlungsquelle sind in 8 parallel zueinander verlaufenden Reihen mit jeweils 6 Dioden hintereinander angebracht und symmetrisch über die gesamte Fläche mit den Maßen 22 cm x 18 cm verteilt. Damit wurde im Bestrahlungsabstand von 10 cm zwischen Lampenoberfläche und Mikrotiterplattenoberseite eine homogene Beleuchtung der Mikrokulturen gewährleistet. Mit der Lampe konnten jeweils zwei Platten gleichzeitig bestrahlt werden. Auf Höhe der Mikrotiterplattenoberfläche befand sich während der gesamten Bestrahlungszeit der Lichtdetektor eines Photometers (ILT 1400, Peabody, USA), um die Bestrahlungsleistung zu erfassen und gleiche Belichtungsbedingungen für alle Mikrotiterplatten gewährleisten zu können. Jede Platte wurde mit einer Bestrahlungsenergie von

20 J/cm² bei einer Wellenlänge von 420 nm belichtet, wozu etwa 7 Minuten benötigt wurden. Die Bestrahlung der Mikrotiterplatten erfolgte in unverschlossenem Zustand, um eine mögliche Abschwächung der Lichtstrahlung durch eine Abdeckung zu verhindern.

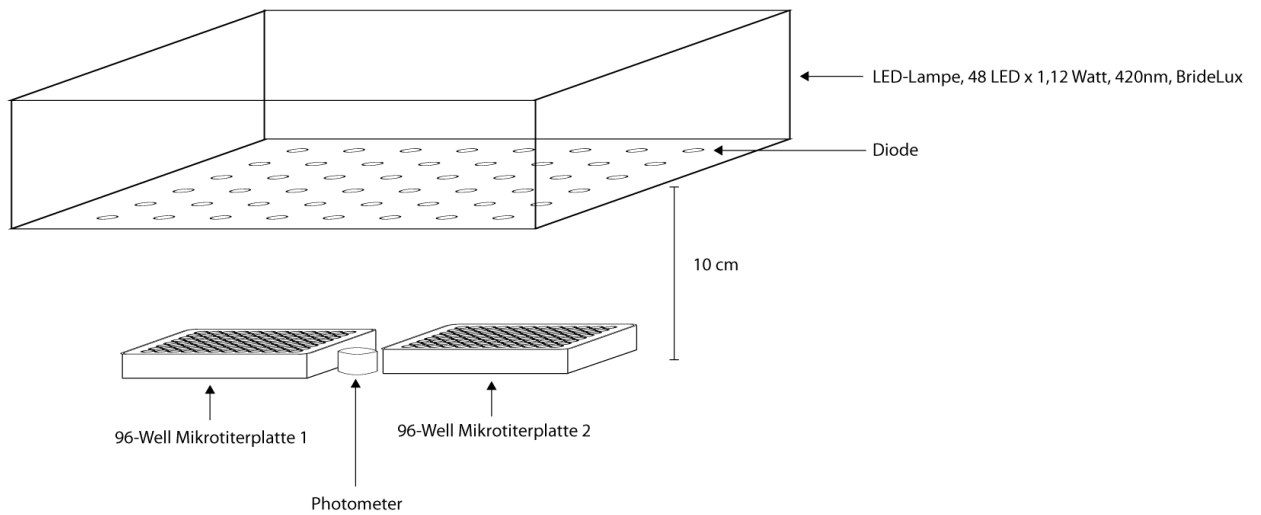


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Belichtungsbaus

2.6 Versuchsaufbau

Die Inhibitionsversuche wurden mit 96-Well Mikrotiterplatten (96 well, FALCON, Corning Incorporated, New York, USA) durchgeführt. Auf einer Platte befinden sich 96 Kavitäten, die in 8 waagerechten (A-H) und 12 senkrechten Reihen (1-12) angeordnet sind (Abbildung 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abbildung 3: Schema 96-Well Mikrotiterplatte

Insgesamt wurde mit fünf *T. rubrum* Stämmen gearbeitet, wobei jede Mikrotiterplatte jeweils dreifach mit Konidien sowie dreifach mit Myzelfragmenten eines Stammes beschickt wurde. Zudem wurden von jedem Stamm jeweils 2 Mikrotiterplatten bestückt, da eine Platte mit 20 J/cm² bestrahlt wurde, während die andere Platte als Negativkontrolle unbestrahlt blieb. Letztlich wurde in dieser Versuchsreihe nun mit insgesamt 10 Mikrotiterplatten gearbeitet. Jede Mikrotiterplatte wurde nach dem gleichen Schema beschickt. Zunächst wurden die Kavitäten der 96-Well Mikrotiterplatten mit 50 µl Myzelsuspension bzw. Konidiensuspension befüllt. Anschließend wurden diesen Kavitäten jeweils 50 µl der vier unterschiedlichen Curcuminkonzentrationen (Cur 1, Cur 2, Cur 3, Cur 4) zugefügt. Dies wurde im dreifachen Ansatz für das in DMSO gelöste Curcumin sowie das micellierte Curcumin durchgeführt.

Die Kavitäten, die nicht mit Curcuminlösung beschickt wurden, sollten einerseits als Negativkontrolle dienen und wurden entweder mit 50 µl Phosphatpuffer, mit 50 µl DMSO oder mit 50 µl Fluconazol beschickt oder sie dienten andererseits als Positivkontrolle und wurden mit 50 µl Sabouraud-Bouillon beschickt. Danach wurden die 96-Well Mikrotiterplatten für einen Zeitraum von 20 Minuten dunkel inkubiert bei 26°C und schließlich wurde allen Kavitäten 100 µl Sabouraud-Bouillon hinzugefügt mit Ausnahme der Reihe, die bereits mit 50 µl Phosphat-Puffer beschickt wurde, dieser wurden weitere 100 µl Phosphat-Puffer hinzugefügt (Negativkontrolle).

Nun lag in allen beschickten Kavitäten ein Volumen von 200 µl vor, was unter anderem zu einer Reduktion der ursprünglichen Curcuminkonzentrationen führte. Die durch die weiteren Substanzen in den Kavitäten verdünnten Curcuminkonzentrationen lagen nun wie folgt vor: Cur 1, Cur 2, Cur 3 und Cur 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Myzel Cur 1 ^A Sab	Myzel Cur 1 ^A Sab	Myzel Cur 1 ^A Sab	Myzel Cur 1 ^B Sab	Myzel Cur 1 ^B Sab	Myzel Cur 1 ^B Sab	Konid. Cur 1 ^A Sab	Konid. Cur 1 ^A Sab	Konid. Cur 1 ^A Sab	Konid. Cur 1 ^B Sab	Konid. Cur 1 ^B Sab	Konid. Cur 1 ^B Sab
B	Myzel Cur 2 ^A Sab	Myzel Cur 2 ^A Sab	Myzel Cur 2 ^A Sab	Myzel Cur 2 ^B Sab	Myzel Cur 2 ^B Sab	Myzel Cur 2 ^B Sab	Konid. Cur 2 ^A Sab	Konid. Cur 2 ^A Sab	Konid. Cur 2 ^A Sab	Konid. Cur 2 ^B Sab	Konid. Cur 2 ^B Sab	Konid. Cur 2 ^B Sab
C	Myzel Cur 3 ^A Sab	Myzel Cur 3 ^A Sab	Myzel Cur 3 ^A Sab	Myzel Cur 3 ^B Sab	Myzel Cur 3 ^B Sab	Myzel Cur 3 ^B Sab	Konid. Cur 3 ^A Sab	Konid. Cur 3 ^A Sab	Konid. Cur 3 ^A Sab	Konid. Cur 3 ^B Sab	Konid. Cur 3 ^B Sab	Konid. Cur 3 ^B Sab
D	Myzel Cur 4 ^A Sab	Myzel Cur 4 ^A Sab	Myzel Cur 4 ^A Sab	Myzel Cur 4 ^B Sab	Myzel Cur 4 ^B Sab	Myzel Cur 4 ^B Sab	Konid. Cur 4 ^A Sab	Konid. Cur 4 ^A Sab	Konid. Cur 4 ^A Sab	Konid. Cur 4 ^B Sab	Konid. Cur 4 ^B Sab	Konid. Cur 4 ^B Sab
E	Myzel Puffer ^B	Myzel Puffer ^B	Myzel Puffer ^B	leer	leer	leer	Konid. Puffer ^B	Konid. Puffer ^B	Konid. Puffer ^B	leer	leer	leer
F	Myzel DMSO Sab	Myzel DMSO Sab	Myzel DMSO Sab	leer	leer	leer	Konid. DMSO Sab	Konid. DMSO Sab	Konid. DMSO Sab	leer	leer	leer
G	Myzel Puffer ^A Sab	Myzel Puffer ^A Sab	Myzel Puffer ^A Sab	leer	leer	leer	Konid. Puffer ^A Sab	Konid. Puffer ^A Sab	Konid. Puffer ^A Sab	leer	leer	leer
H	Myzel Fluc Sab	Myzel Fluc Sab	Myzel Fluc Sab	leer	leer	leer	Konid. Fluc Sab	Konid. Fluc Sab	Konid. Fluc Sab	leer	leer	leer

Abbildung 4: Beschickung der 96-Well Mikrotiterplatte mit Myzelfragmenten, Konidien, Puffer, DMSO, Curcumin, Fluconazol und Sabouraud-Lösung

Eingesetzte Substanzen und ihre Konzentration vor Inokulation:

Myzel:	50 µl Myzel
Konid.:	50 µl Konidien in der Konzentration $2 \cdot 10^5$ Konidien/ml
Puffer ^A :	50 µl Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 5,5
Puffer ^B :	150 µl Phosphatpuffer nach Sörensen, pH 5,5
DMSO:	50 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) 4% in Puffer
Cur 1 ^A :	50 µl Curcumin micelliert 20 mg/l in Puffer
Cur 2 ^A :	50 µl Curcumin micelliert 10 mg/l in Puffer
Cur 3 ^A :	50 µl Curcumin micelliert 5 mg/l in Puffer
Cur 4 ^A :	50 µl Curcumin micelliert 2,5 mg/l in Puffer
Cur 1 ^B :	50 µl Curcumin 20 mg/l in 4% DMSO/Puffer
Cur 2 ^B :	50 µl Curcumin 10 mg/l in 4% DMSO/Puffer
Cur 3 ^B :	50 µl Curcumin 5 mg/l in 4% DMSO/Puffer
Cur 4 ^B :	50 µl Curcumin 2,5 mg/l in 4% DMSO/Puffer
Fluc:	50 µl Fluconazol 2 mg/ml gelöst in Aqua destillata
Sab:	100 µl Sabouraud
leer:	ungefüllte Kavität

Nachdem nun alle Mikrotiterplatten vollständig beschickt waren, wurden fünf der zehn Platten mit der beschriebenen LED Lampe (Ingenieurbüro Warnke GmbH, Wietzenhof, Deutschland) bestrahlt, die monochromatisches Licht der Wellenlänge 420 nm emittierte. Die anderen fünf, jeweils identisch beschickten Mikrotiterplatten eines Stammes, wurden nicht bestrahlt und dienten als Kontrollgruppe. Um gleiche Bedingungen für alle Mikrotiterplatten zu sichern, wurde die Bestrahlungsintensität mit einem Photometer (ILT 1400, International Light Technologies, Massachusetts, USA) kontrolliert. Alle Platten wurden mit einer Energie von 20 J/cm^2 bestrahlt, die Bestrahlung dauerte im Durchschnitt 7 Minuten. Die Bestrahlung aller Ansätze eines *T. rubrum* Stammes erfolgte synchron, um identische Bedingungen für die Konidien, Myzelfragmente und die Kontrollen zu gewährleisten. Während der Bestrahlung konnte anhand von Temperaturmessungen sichergestellt werden, dass die Inhalte der Mikrotiterplatten nicht erwärmt wurden. Nach der Bestrahlung konnte ein deutlicher Farbverlust des Curcumins beobachtet werden.

Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Kavitäten jeder Platte mittels Photometer (Sunrise Remote™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei monochromatischem Licht der Wellenlänge 620 nm bestimmt. Dieser Wert diente als Ausgangswert (Zeitpunkt 0) zum Vergleich mit den folgenden Messergebnissen. Abschließend erfolgte die Lagerung der Mikrotiterplatten bei Dunkelinkubation, einer Temperatur von 21°C und bei kontinuierlichem Schütteln mit der Einstellung 60/min auf einem Kreisschüttler (GFL type 3015, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) über den gesamten Zeitraum der Versuchsreihe von insgesamt 9 Tagen.

An Tag 0 (Zeitpunkt 0) bis Tag 5 (Zeitpunkt 5) wurden alle 24 Stunden einmalig Extinktionsmessungen der Kavitäten mittels Photometer durchgeführt. An den Tagen 6 bis 8 wurden keine Messungen durchgeführt. Die letzte Messung erfolgte an Tag 9 (Zeitpunkt 6).

Parallel zu den Messungen wurden mikroskopische Kontrollen der Mikrotiterplatten durchgeführt und es wurde ein Stamm exemplarisch ausgewählt, bei dem das Wachstum in den Kavitäten der Platten über den gesamten Zeitraum regelmäßig fotografiert wurde.

Da den Kavitäten der Reihe E (Abbildung 4) kein Nährmedium zugesetzt worden war, wurde erwartet, dass es in dieser Reihe unabhängig von der Bestrahlung zu keinem Dermatophytenwachstum und somit zu keinem Anstieg der Extinktionswerte kommen würde. Die Kavitäten der Reihe F (Abbildung 4), die mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) befüllt wurden, dienten der Untersuchung einer möglichen Beeinflussung des Dermatophytenwachstums durch DMSO allein. Für die Kavitäten der Reihe G (Abbildung 4), die lediglich Sabouraud-Bouillon als Zusatz erhielten, wurde erwartet, dass es zu ungehemmtem Wachstum der Dermatophyten und somit zu einem deutlichen Anstieg der Extinktionswerte kommen würde. Für die Kavitäten der Reihe H (Abbildung 4), die ebenfalls keinen Photosensibilisator erhielten, sondern das Antimykotikum Fluconazol, wurde erwartet, dass es bestrahlungsunabhängig zu einer deutlichen Hemmung des Wachstums kommen würde. Für die Kavitäten der Reihen A bis D (Abbildung 4), in denen Myzel sowie Konidien mit dem Photosensibilisator Curcumin versetzt worden waren, wurde eine deutliche bestrahlungsabhängige Wachstumshemmung erwartet. Da Curcumin auch in unbestrahltem Zustand das Dermatophytenwachstum hemmen kann, wurde mit einer Reduktion der Extinktion auch in den unbestrahlten Ansätzen gerechnet, jedoch sollte der wachstumshemmende Effekt nach erfolgter Bestrahlung noch ausgeprägter sein.

Abschließend wurde von allen Kavitäten der 96-Well Mikrotiterplatten ein Ausstrich auf Schafsblutagar (MHS bio Mérieux, Lyon, Frankreich) durchgeführt, um mögliche bakterielle Verunreinigungen aufzudecken. Die Schafsblutagarplatten wurden bei 37°C inkubiert und nach 24 Stunden sowie nach 48 Stunden wurden makroskopische Kontrollen durchgeführt, in denen eine Kontamination ausgeschlossen werden konnte.

Zudem fand eine Fortsetzung der Beobachtung des Dermatophytenwachstums anhand makroskopischer Kontrollen statt. Zu diesem Zwecke wurden die Inhalte bestimmter Kavitäten der Mikrotiterplatten nach den letzten photometrischen Messungen und mikroskopischen Kontrollen (Tag 9) gepoolt auf Dermatophytenagarplatten ausgestrichen und im Brutschrank bei 27°C für einen Zeitraum von 8 Tagen inkubiert. Für diese Untersuchung wurden lediglich die Ansätze verwendet, die mit Cur 1/DMSO, Cur 2/DMSO o-

der mit Fluconazol behandelt und bestrahlt worden waren. Ansätze mit Konidienbefüllung und Myzelfragmentbefüllung wurden separat gepoolt. Insgesamt wurden für diese Untersuchung 6 Agarplatten verwendet. Auf 2 Agarplatten wurde der gepoolte Inhalt aller Kavitäten, die mit Cur 1/DMSO behandelt und bestrahlt worden waren ausgestrichen, wobei auf einer Platte die Ansätze mit den Myzelfragmenten der 5 Stämme gepoolt wurden und auf einer Platte die Ansätze mit den Konidiensuspensionen der 5 Stämme zusammen ausgestrichen wurden. Auf 2 Agarplatten wurde der gepoolte Inhalt aller Kavitäten, die mit Cur 2/DMSO behandelt und bestrahlt worden waren, ausgestrichen. Auf 2 Agarplatten wurde der gepoolte Inhalt aller Kavitäten, die mit Fluconazol behandelt und bestrahlt worden waren, ausgestrichen, wiederum getrennt für die Ansätze mit Myzelfragmenten und Konidien.

2.7 Statistische Methoden

Die Wahl der statistischen Methoden zur Auswertung der durchgeführten Messungen erfolgte, ebenso wie die Durchführung der statistischen Auswertung, unter der Betreuung durch Herrn Dr. rer. nat. Thomas Möbius vom Institut für Medizinische Informatik und Statistik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Micheal Krawczak.

Die statistische Auswertung bezieht sich auf die erhobenen Messungen zu den Zeitpunkten Tag 0 (Versuchstag), Tag 1 (24 Stunden nach Versuchsdurchführung), Tag 2 (48 Stunden nach Versuchsdurchführung), Tag 3 (72 Stunden nach Versuchsdurchführung), Tag 4 (96 Stunden nach Versuchsdurchführung), Tag 5 (120 Stunden nach Versuchsdurchführung) und Tag 9 (216 Stunden nach Versuchsdurchführung).

Die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen bei Ansätzen mit Myzelfragmenten und Konidien der 5 *T. rubrum* Stämme sowie ihrer jeweiligen 3 Ansätze wurden zusammengefasst, da sich keine wesentlichen quantitativen Unterschiede darstellten.

Alle statistischen Auswertungen sowie die statistischen Tests wurden mit dem Programm Excel 2007 durchgeführt, wobei die graphische Darstellung mit dem Programm Veusz 1.25.1 erfolgte.

Zunächst wurden deskriptive Diagramme (Abbildungen 4 bis 14) erstellt, die den Dermatophytenwachstumsverlauf zwischen Tag 0 und Tag 9 darstellen.

Daraufhin wurde der absolute Effekt der Bestrahlung, d.h. die Differenz der Extinktionen bei Bestrahlung an Tag 0 zu Tag 9, relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung analysiert. Dazu wurde eine mehrfaktorielle ANOVA modelliert und es kam der F-Test zur Anwendung, um Aussagen darüber treffen zu können, welche Variablen das Wachstum der Dermatophyten signifikant beeinflussen.

Schließlich wurde der Zweistichproben-t-Test für unverbundene Stichproben angewendet, um auf Unterschiede in der Wachstumshemmung durch Curcumin mit DMSO gegenüber Curcumin micelliert für die höchste eingesetzte Curcuminkonzentration zu testen. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von 1% festgelegt, das einem p-Wert von $<0,01$ entspricht.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

In der Arbeit von Brasch et al. (Brasch et al. 2017) konnte bereits ein wachstumsinhibierender Effekt von Curcumin gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kombination mit einer einmaligen Bestrahlung der Wellenlänge 367 nm und einer Bestrahlungsintensität von 5 J/cm² bei den Dermatophyten *T. rubrum*, *E. floccosum*, *T. interdigitale*, *M. gypseum*, *M. canis* und *T. terrestre* beobachtet werden. Die folgende Arbeit sollte dazu dienen, weitere Erkenntnisse besonders im Hinblick auf die micellierte Aufbereitung von Curcumin, eine besser an das Absorptionsmaximum von Curcumin adaptierte Lichtquelle mit geeigneter Bestrahlungsintensität sowie Myzelfragmenten als zusätzlichen Wachstumseinheiten zu liefern.

Die Vorversuche wurden durchgeführt, um die neue Curcuminformulierung in micellierter Form auf ihr Löslichkeitsverhalten und ihren wachstumsinhibierenden Effekt auf Dermatophyten zu untersuchen. Um eine Vergleichbarkeit der erhobenen Beobachtungen gewährleisten zu können, wurden die Versuche weitestgehend anhand der gleichen Methodik durchgeführt, wie sie von Brasch et al. verwendet wurden. Als Bestrahlungsquelle diente jedoch eine speziell konstruierte LED-Leuchte (Ingenieurbüro Wanke GmbH, Wietzenhof, Deutschland), die Licht der Wellenlänge 420 nm emittierte.

Es zeigte sich bei den ersten Versuchen ein bestrahlungsabhängiger, wachstumsinhibierender Effekt des micellierten Curcumins (Curcumin NovaSol®, AQUANOVA AG, Darmstadt, Deutschland) in einer Dosierung von 5 mg/l auf *E. floccosum*, der während eines Beobachtungszeitraumes von 10 Tagen dem wachstumsinhibierenden Effekt von Curcumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gelöst in DMSO sowie Fluconazol entsprach.

In den weiteren Versuchen wurde ausschließlich mit *T. rubrum* gearbeitet, da diese Dermatophytenart ca. 90 % der Dermatophytosen in Deutschland verursacht (Seebacher et al. 2008).

Es wurden Bestrahlungsintensitäten von 10 bis 80 J/cm² eingesetzt und auf ihre wachstumshemmenden Effekte untersucht. Dabei zeigte sich durch photometrische Messungen vor der Bestrahlung sowie direkt im Anschluss an die erfolgte Bestrahlung kein signifikanter Effekt der alleinigen Bestrahlung. Es konnte beobachtet werden, dass bei den untersuchten *T. rubrum* Stämmen die eingesetzten Curcuminkonzentrationen von 6 mg/l und 60 mg/l in micellierter Form zu einer Wachstumsverzögerung an den Tagen 3-6 führten. Um die echten photodynamischen Effekte des micellierten Curcumins zu bestimmen, wurden die Hauptversuche mit Curcuminkonzentrationen von 5 mg/l und weniger durchgeführt.

Da bei Bestrahlungsintensitäten von 40 J/cm² und 80 J/cm² auch ohne Curcumin (*T. rubrum* inokuliert mit Phosphatpuffer und Sabouraud-Nährlösung) eine Verzögerung des Dermatophytenwachstums beobachtet wurde, ist im Hauptversuch ausschließlich mit einer Bestrahlungsintensität von 20 J/cm² bestrahlt worden. Ein hemmender Effekt durch die alleinige Bestrahlung konnte bei 20 J/cm² nicht mehr beobachtet werden.

3.2 Hauptversuche

3.2.1 Dermatophytenwachstumsverlauf von Tag 0 bis Tag 9

Die Abbildungen stellen den Wachstumsverlauf der Dermatophyten über den Zeitraum von Tag 0 bis Tag 9 dar. Hierbei werden jeweils betrachtet der Einfluss von Curcumin mit DMSO sowie micelliertem Curcumin in 4 unterschiedlichen Konzentrationen auf das Wachstum von *T. rubrum*. Zudem stellt jeweils ein Diagramm den Wachstumsverlauf ohne Bestrahlung bzw. nach erfolgter Bestrahlung dar.

In den folgenden Diagrammen wird aus Gründen der Übersichtlichkeit die Wachstumskurve für den Zusatz DMSO ohne Curcumin nicht dargestellt. Es wurde geprüft, ob DMSO allein bereits einen signifikanten Einfluss auf das Dermatophytenwachstum hat. Da sich dabei durchweg kein signifikanter Einfluss von DMSO auf das Wachstum der Dermatophyten zeigte, wird auf die Darstellung der Wachstumskurve unter alleinigem DMSO-Zusatz aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Die Bezeichnung „Leerkontrolle“

bedeutet, dass als Zusatz das Nährmedium Sabouraud-Boullion verwendet wurde. Dieser Ansatz dient damit als Positivkontrolle. Die Bezeichnung „Pufferlösung“ bedeutet den ausschließlichen Zusatz von Phosphatpuffer. Da dieser keine Nährstoffe enthält, dient dieser Ansatz als Negativkontrolle. Die Wachstumskurven für Fluconazol und Pufferlösung werden jeweils separat dargestellt, da es hierbei zu Überlagerungen mit weiteren Wachstumskurven kam.

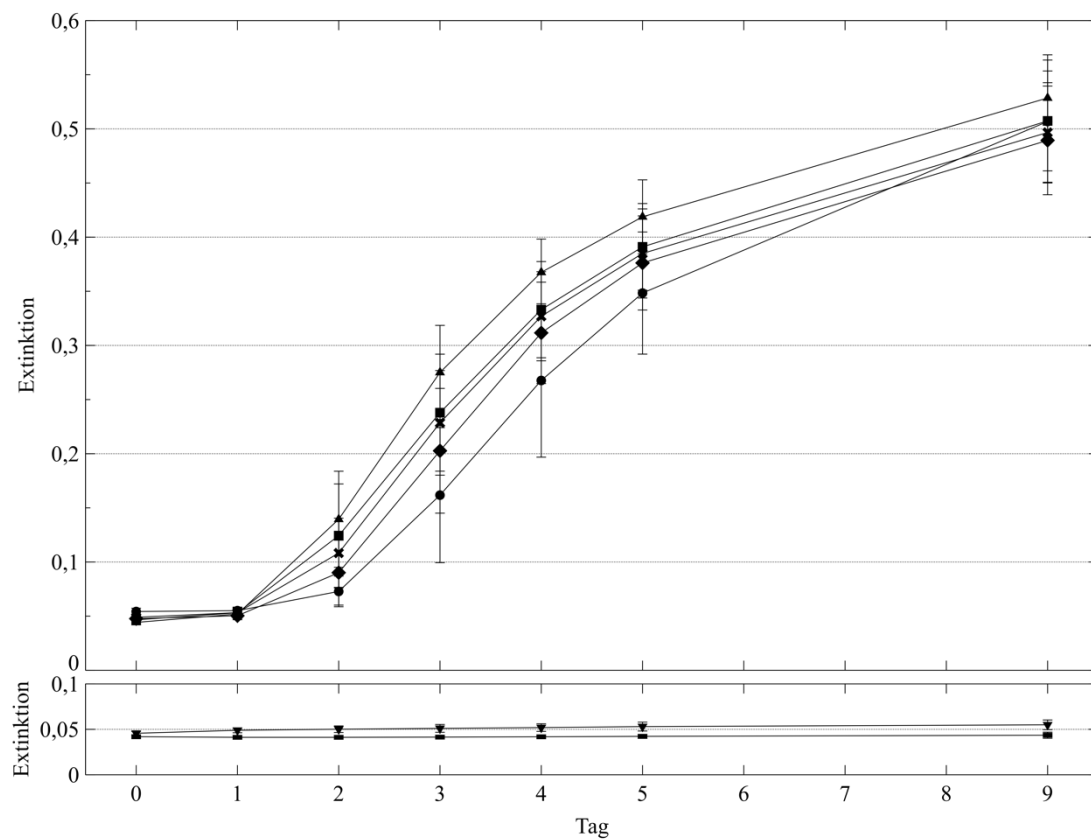


Abbildung 5: Wachstumsverlauf unter Curcumin/DMSO, unbestrahlt, Tag 0 bis 9

Die Abbildung 5 zeigt den Wachstumsverlauf des Myzels und der Konidien von *T. rubrum* über 9 Tage Inkubationszeit, unbestrahlter Versuchsansatz:

- Cur 1/DMSO: Curcumin 5 mg/l in 1% DMSO/Puffer*,
- ◆ Cur 2/DMSO: Curcumin 2,5 mg/l in 1% DMSO/Puffer*,
- ✱ Cur 3/DMSO: Curcumin 1,25 mg/l in 1% DMSO/Puffer*,
- Cur 4/DMSO: Curcumin 0,625 mg/l in 1% DMSO/Puffer*,

- +— **Leerkontrolle: Sabouraud-Bouillon ohne Curcumin,**
- +— **Fluconazol: 0,5 mg/ml in Aqua dest. (ausgelagert in separates Diagramm),**
- +— **Pufferlösung: Phosphatpuffer nach Sörensen pH 5,5 (ausgelagert in separates Diagramm)**

***Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.**

Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichungen der Extinktionswerte von 5 *T. rubrum* Stämmen, wobei jeweils Myzelfragmente und Konidien im dreifachen Ansatz verwendet wurden (n=30).

Im unbestrahlten Versuchsansatz mit Curcumin und DMSO ist über den gesamten Zeitverlauf bei allen eingesetzten Konzentrationen keine Wachstumshemmung im Vergleich zur Leerkontrolle sichtbar.

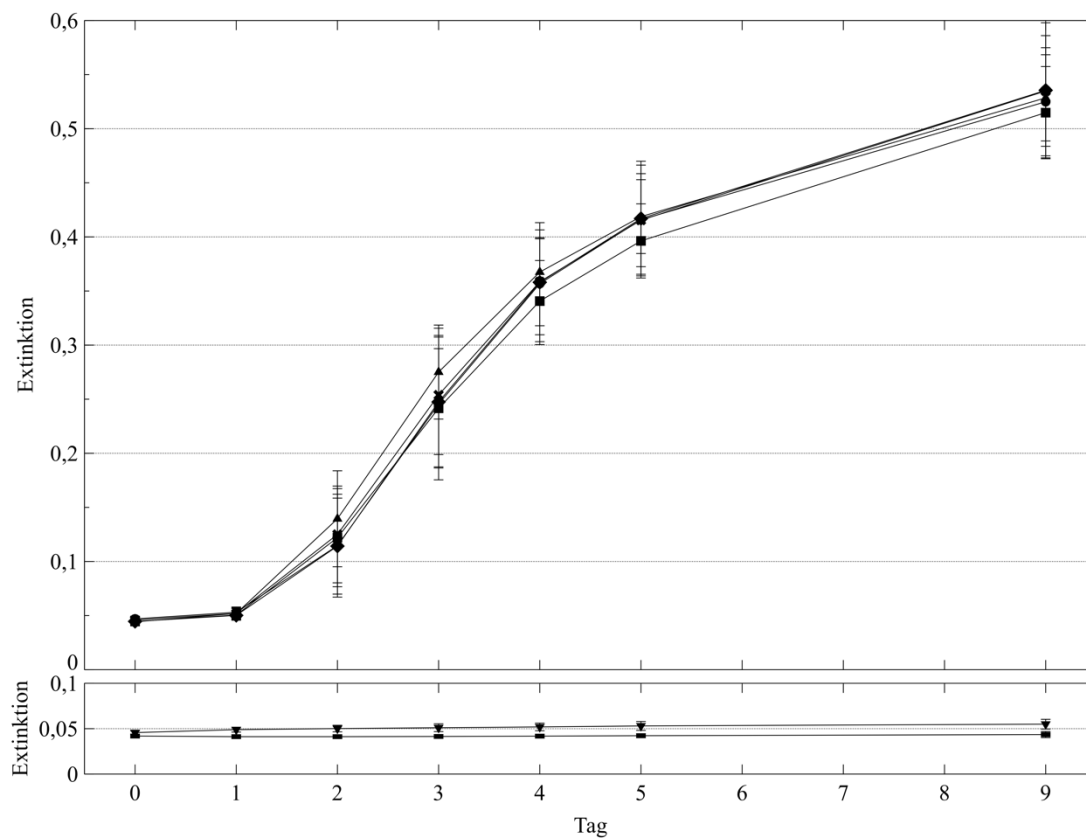


Abbildung 6: Wachstumsverlauf unter Curcumin/micelliert, unbestrahlt, Tag 0 bis 9

Die Abbildung 6 zeigt den Wachstumsverlauf des Myzels und der Konidien von *T. rubrum* über 9 Tage Inkubationszeit, unbestrahlter Versuchsansatz:

- Cur 1/micelliert: Curcumin 5 mg/l in Puffer*,
- ◆ Cur 2/micelliert: Curcumin 2,5 mg/l in Puffer*,
- * Cur 3/micelliert: Curcumin 1,25 mg/l in Puffer*,
- Cur 4/micelliert: Curcumin 0,625 mg/l in Puffer*,
- ▲ Leerkontrolle: Sabouraud-Bouillon ohne Curcumin,
- ▼ Fluconazol: 0,5 mg/ml in Aqua dest. (ausgelagert in separates Diagramm),
- Pufferlösung: Phosphatpuffer nach Sörensen pH 5,5 (ausgelagert in separates Diagramm)

***Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.**

Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichungen der Extinktionswerte von 5 *T. rubrum* Stämmen, wobei jeweils Myzelfragmente und Konidien im dreifachen Ansatz verwendet wurden (n=30).

Im unbestrahlten Versuchsansatz mit micelliertem Curcumin ist über den gesamten Zeitverlauf bei allen eingesetzten Konzentrationen keine Wachstumshemmung im Vergleich zur Leerkontrolle sichtbar.

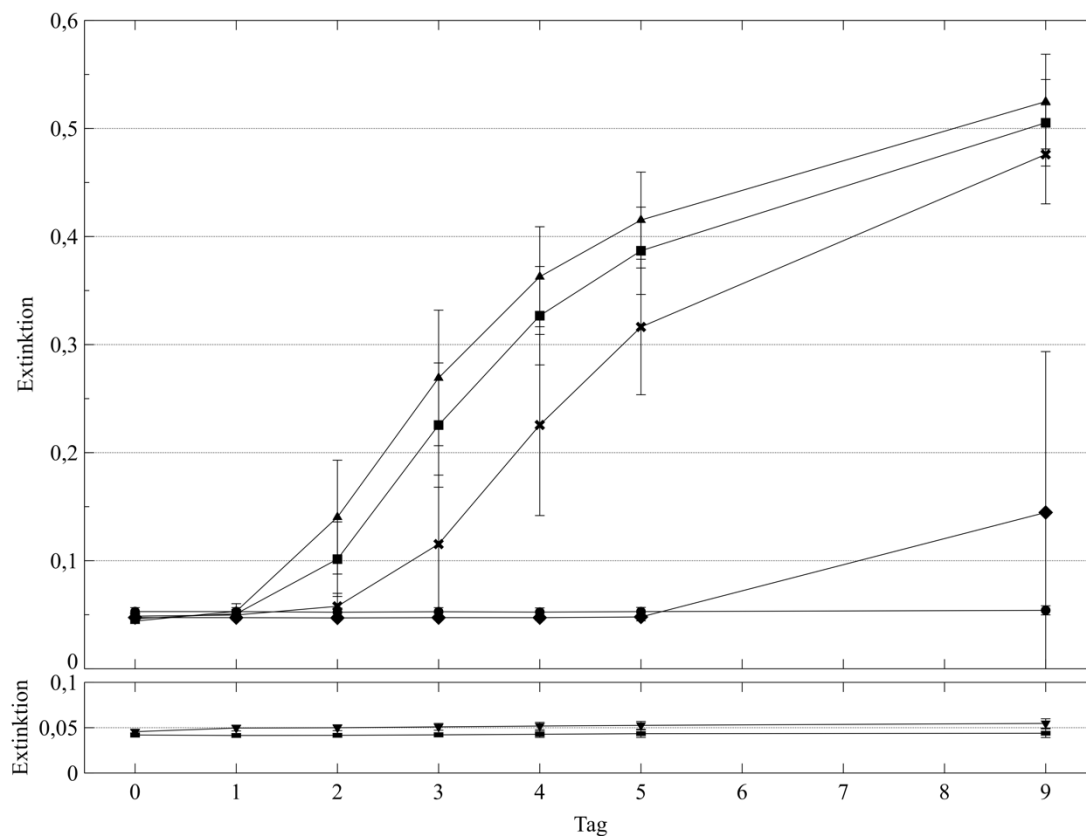


Abbildung 7: Wachstumsverlauf unter Curcumin/DMSO, bestrahlt, Tag 0 bis 9

Die Abbildung 7 zeigt den Wachstumsverlauf des Myzels und Konidien von *T. rubrum* über 9 Tage Inkubationszeit, bestrahlter Versuchsansatz:

- Cur 1/DMSO: Curcumin 5 mg/l in 1% DMSO/Puffer*,
- ◆ Cur 2/DMSO: Curcumin 2,5 mg/l in 1% DMSO/Puffer*,
- * Cur 3/DMSO: Curcumin 1,25 mg/l in 1% DMSO/Puffer*,
- Cur 4/DMSO: Curcumin 0,625 mg/l in 1% DMSO/Puffer*,
- ▲ Leerkontrolle: Sabouraud-Bouillon ohne Curcumin,
- ▼ Fluconazol: 0,5 mg/ml in Aqua dest. (ausgelagert in separates Diagramm),
- Pufferlösung: Phosphatpuffer nach Sörensen pH 5,5 (ausgelagert in separates Diagramm)

***Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.**

Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichungen der Extinktionswerte von 5 *T. rubrum* Stämmen, wobei jeweils Myzelfragmente und Konidien im dreifachen Ansatz verwendet wurden (n=30).

Im bestrahlten Versuchsansatz mit Curcumin/DMSO konnte das Wachstum von *T. rubrum* durch Cur 1/DMSO und Cur 2/DMSO gehemmt werden. Während Cur 1/DMSO das Wachstum über den gesamten Versuchszeitraum mit der gleichen Effektstärke hemmt, kann beim Ansatz mit der geringeren Curcuminkonzentration Cur 2/DMSO an Tag 9 ein Anstieg des Dermatophytenwachstums beobachtet werden, dieser Wachstumsanstieg wird in der Abbildung 9 näher untersucht.

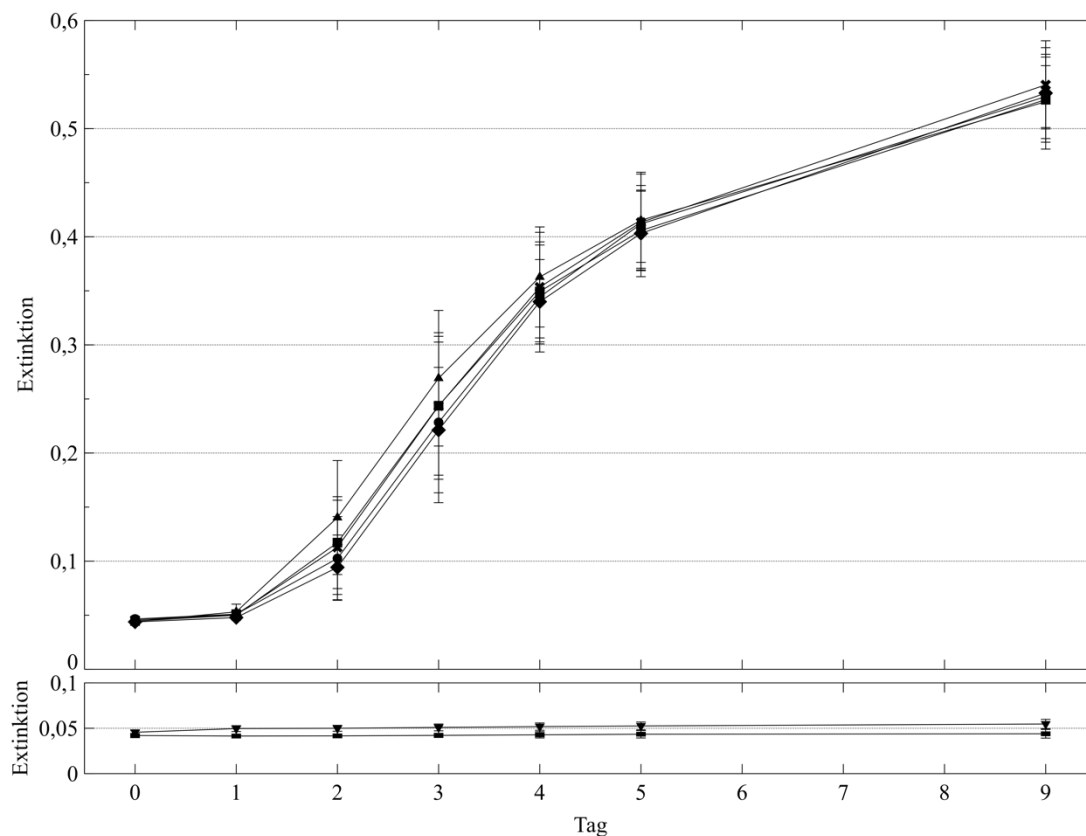


Abbildung 8: Wachstumsverlauf unter Curcumin/micelliert, bestrahlt, Tag 0 bis 9

Die Abbildung 8 zeigt den Wachstumsverlauf des Myzels und der Konidien von *T. rubrum* über 9 Tage Inkubationszeit, bestrahlter Versuchsansatz:

- Cur 1/micelliert: Curcumin 5 mg/l in Puffer*,
- ◆ Cur 2/micelliert: Curcumin 2,5 mg/l in Puffer*,
- * Cur 3/micelliert: Curcumin 1,25 mg/l in Puffer*,
- Cur 4/micelliert: Curcumin 0,625 mg/l in Puffer*,
- ▲ Leerkontrolle: Sabouraud-Bouillon ohne Curcumin,
- ▼ Fluconazol: 0,5 mg/ml in Aqua dest. (ausgelagert in separates Diagramm),
- Pufferlösung: Phosphatpuffer nach Sörensen pH 5,5 (ausgelagert in separates Diagramm)

***Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.**

Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichungen der Extinktionswerte von 5 *T. rubrum* Stämmen, wobei jeweils Myzelfragmente und Konidien im dreifachen Ansatz verwendet wurden (n=30).

Im bestrahlten Versuchsansatz mit Curcumin/micelliert ist über den gesamten Zeitverlauf bei allen eingesetzten Konzentrationen keine Wachstumshemmung im Vergleich zu Fluconazol sichtbar.

3.2.2 Wachstumsverhalten der 5 eingesetzten *T. rubrum* Stämme unter der Behandlung mit Cur 1/DMSO , Cur 2/DMSO sowie Fluconazol an Tag 9

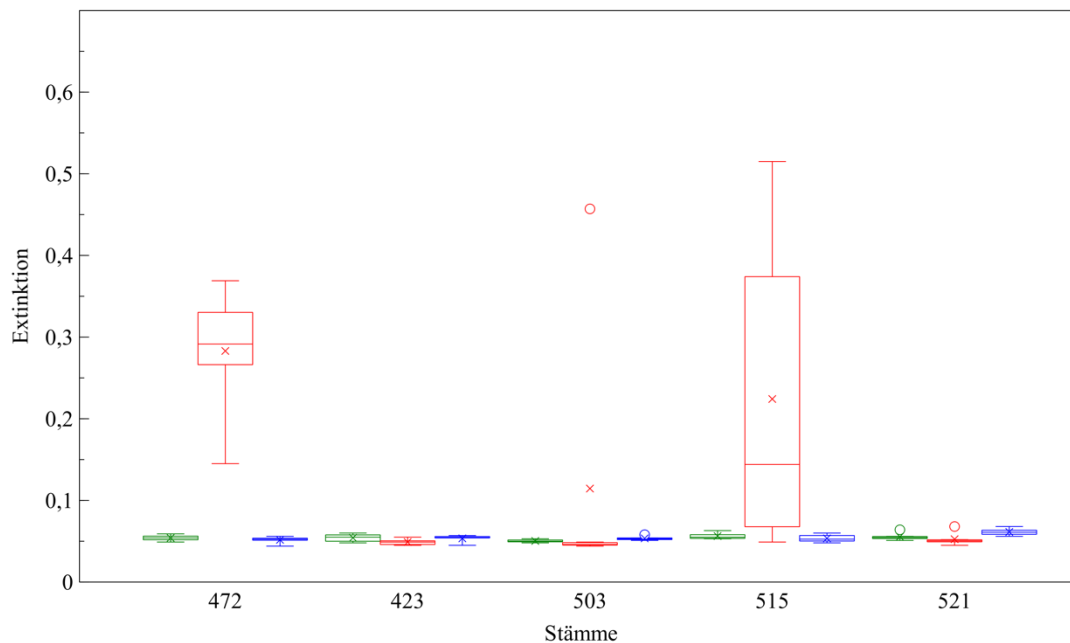


Abbildung 9: Tag 9, bestrahlt

Abbildung 9 zeigt das Wachstumsverhalten der 5 eingesetzten *T. rubrum* Stämme unter der Behandlung mit Cur 1/DMSO, Cur 2/DMSO sowie Fluconazol an Tag 9, bestrahlter Versuchsansatz. Dargestellt ist das Pilzwachstum anhand der Extinktionswerte von den 5 *T. rubrum* Stämmen, wobei jeweils Myzelfragmente und Konidien im dreifachen Ansatz verwendet wurden. Die Darstellung erfolgt in Box-Plot-Modellen separat für die 5 Stämme (n=6):

□ Cur 1/DMSO

□ Cur 2/DMSO

□ Fluconazol

Zunächst ist zu beobachten, dass sowohl unter der Behandlung mit Fluconazol als auch unter der Behandlung mit der höchsten Curcuminkonzentration mit DMSO

(Cur 1/DMSO) eine nahezu identische Wachstumshemmung vorliegt. Unter der Behandlung mit der geringeren Curcuminkonzentration mit DMSO (Cur 2/DMSO) zeigen nicht alle Stämme das gleiche Wachstumsverhalten. Während das Wachstum bei Stamm 423, 503 und 521 gehemmt wurde, zeigen die 2 Stämme 472 und 515 ein gewisses Wachstum. Die gemessenen Extinktionen der Stämme 472 und besonders 515 zeigen hier zudem eine große Streubreite der Extinktionswerte. Bei Stamm 503 ist bei einem Messwert ein Ausreißer nach oben zu beobachten, der entsprechend zu einer Anhebung des Mittelwertes führt, bei ansonsten starker Hemmung des Wachstums.

Das Wachstums unter der Konzentration Cur 2/DMSO, das in Abbildung 7 zur Darstellung kommt, ist folglich nicht auf ein Wachstum aller Stämme zurückzuführen, sondern allein die Folge des Wachstums von 2 der 5 Stämme.

3.2.3 Einfluss von Cur 1/DMSO gegenüber Cur 1/micelliert auf den Wachstumsverlauf von *T. rubrum* über 9 Tage Inkubationszeit

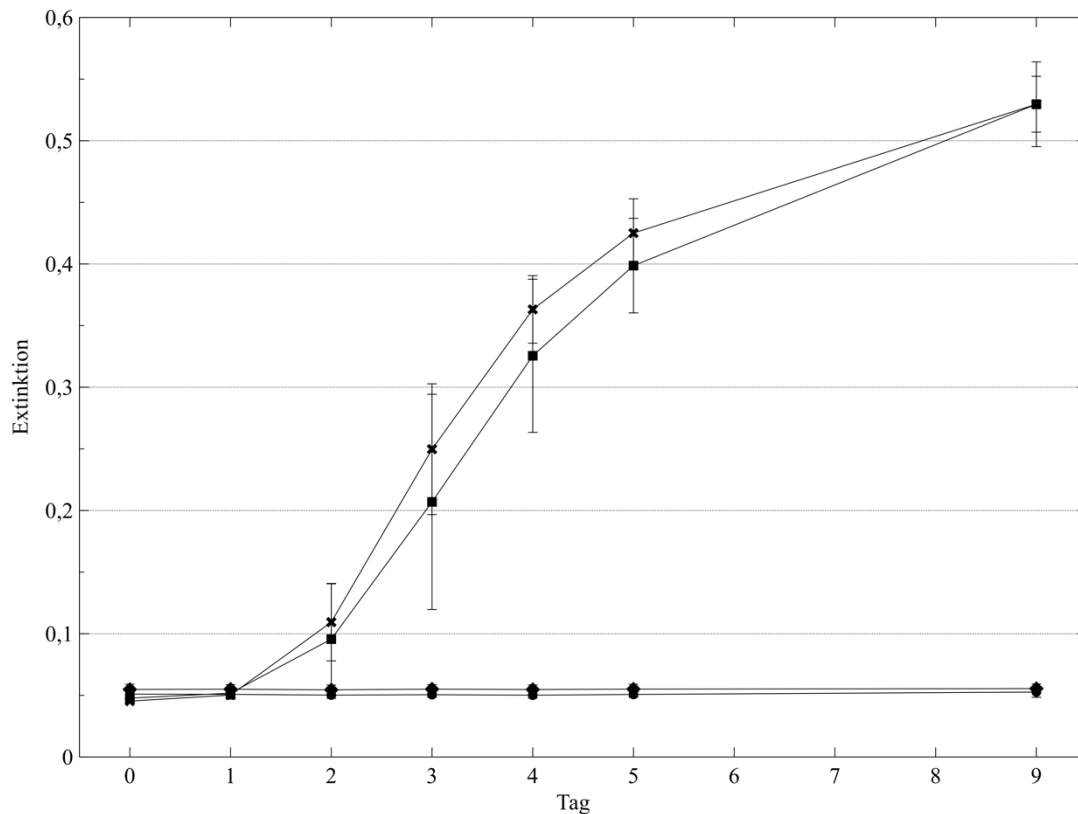


Abbildung 10: Wachstum unter Curcumin, bestrahlt, Tag 0 bis 9

Die Abbildung zeigt den Wachstumsverlauf von *T. rubrum* über 9 Tage Inkubationszeit, bestrahlter Versuchsansatz:

- Cur 1/DMSO: Curcumin 5 mg/l in 1% DMSO/Puffer*, Myzel
- ◆ Cur 1/DMSO: Curcumin 5 mg/l in 1% DMSO/Puffer*, Konidien
- * Cur 1/micelliert: Curcumin 5 mg/l in Puffer*, Myzel
- Cur 1/micelliert: Curcumin 5 mg/l in Puffer*, Konidien

*Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.

Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichungen der Extinktionswerte von 5 *T. rubrum* Stämmen unter der Behandlung mit Cur 1/DMSO sowie Cur/micelliert, wobei jeweils Myzel und Konidien im dreifachen Ansatz verwendet wurden (n=15).

Unter der höchsten Curcuminkonzentration Cur 1/DMSO kommt es im Gegensatz zu Cur 1/micelliert zu einer Wachstumshemmung der Dermatophyten. Die Wachstumskurven für die Ansätze mit Myzelfragmenten und Konidien sind annähernd identisch.

3.2.4 Einfluss von Cur 1/DMSO gegenüber Cur 1/micelliert auf den Wachstumsverlauf des Myzels und der Konidien von *T. rubrum* an Tag 9

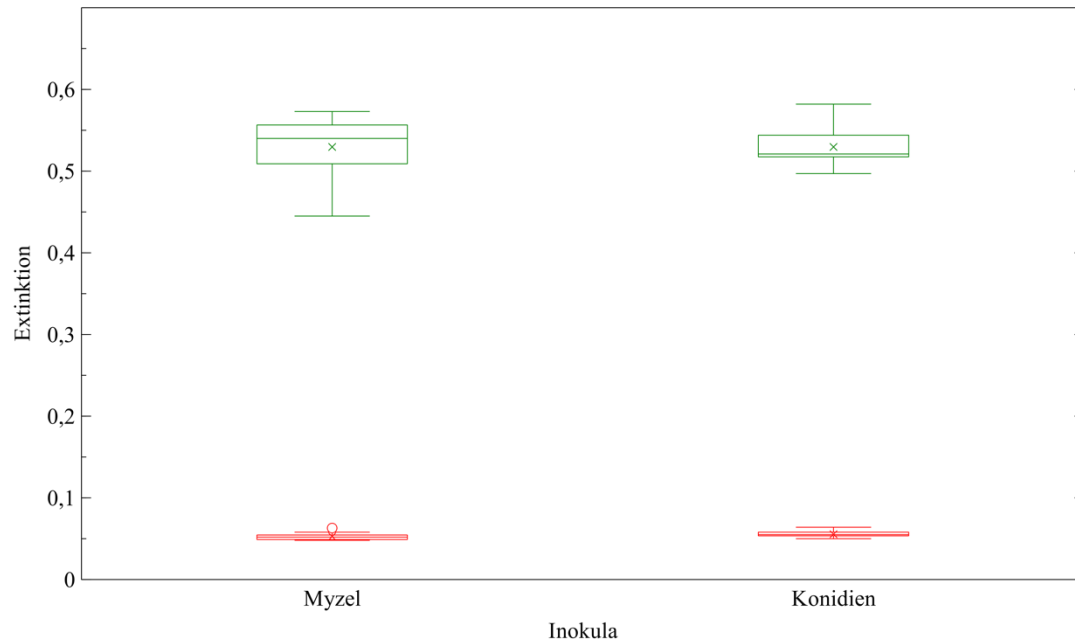


Abbildung 11: Cur 1, Tag 9, bestrahlt

Wachstumsverhalten der 5 *T. rubrum* Stämme unter der Behandlung mit Cur 1/DMSO sowie Cur 1/micelliert an Tag 9, bestrahlter Versuchsansatz. Dargestellt ist das Pilzwachstum anhand der gemessenen Extinktionen mittels Box-Plot-Modellen für die Ansätze mit Myzelfragmenten und Konidien unter Zusatz von Cur 1/DMSO und Cur 1/micelliert (n=15):

□ Cur 1/micelliert

□ Cur 1/DMSO

Unter der Behandlung mit Cur 1/DMSO kann sowohl für die Ansätze mit Myzelfragmenten als auch mit Konidien eine identische Hemmung des Wachstums aller *T. rubrum* Stämme beobachtet werden, während unter der Behandlung mit Cur 1/micelliert sowohl bei den Myzelfragmenten als auch bei den Konidien Wachstum zu beobachten ist.

3.2.5 Der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung

Im folgenden Abschnitt wird der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung für die unterschiedlichen Curcuminformen betrachtet. Der absolute Effekt ergibt sich aus der Wachstumsdifferenz von Tag 9 zu Tag 0. Der relative Effekt zwischen bestrahltem und unbestrahltem Versuchsansatz ergibt sich, indem der Quotient aus dem absoluten Effekt der Bestrahlung und dem absoluten Effekt ohne Bestrahlung gebildet wird. Tendiert dieser Wert gegen 0, spricht dies für einen starken Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung für die unterschiedlichen Curcuminformen, während Werte, die sich 1 annähern, für keinen Effekt sprechen.

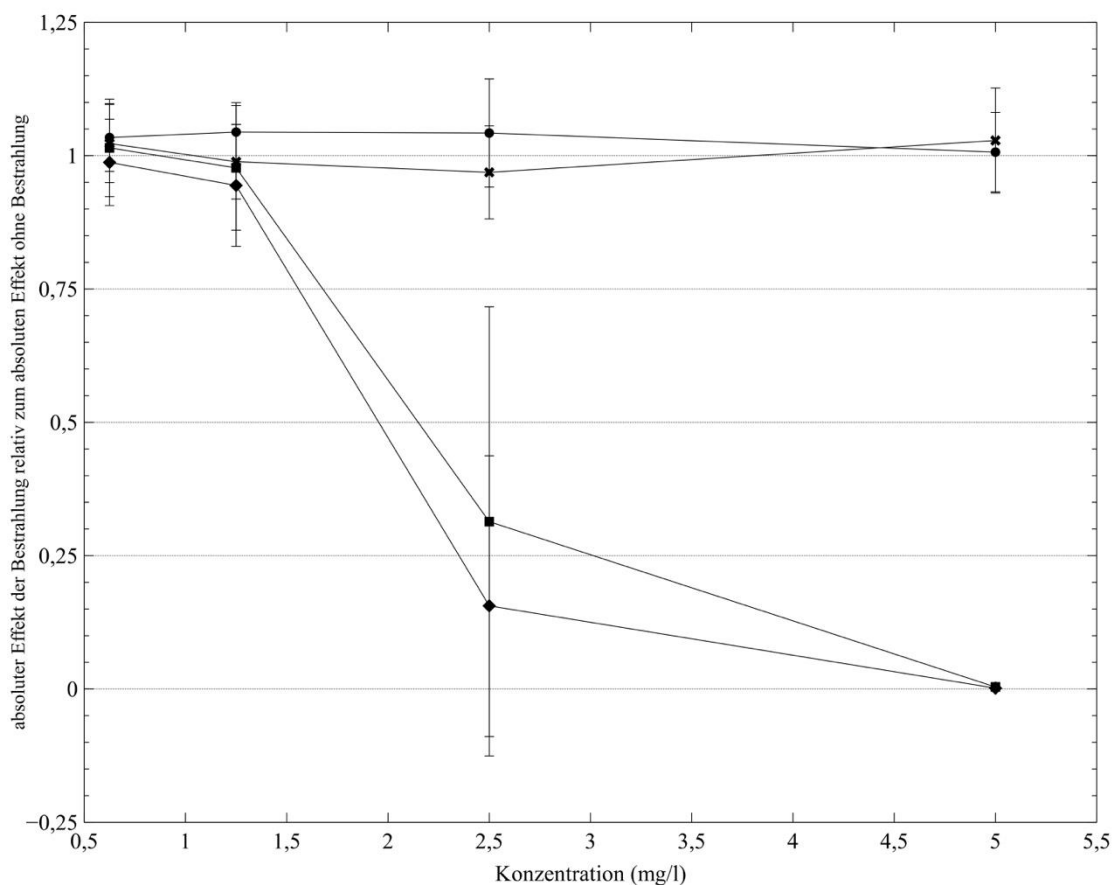






Abbildung 12: Effekt der Bestrahlung bei Zugabe von Curcumin/DMSO im Vergleich zu Curcumin/micelliert

Dargestellt ist der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung in Abhängigkeit der Curcuminkonzentrationen sowohl für die Behandlung mit Curcumin/DMSO als auch für die Behandlung mit Curcumin/micelliert. Der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung beinhaltet das Wachstum aller 5 Stämme mit jeweils 3 Ansätzen (n=15).

Dieser Effekt wurde für die unterschiedlichen Inokula Konidien und Myzelfragmente separat dargestellt, um mögliche Unterschiede bezüglich des untersuchten Effektes sichtbar machen zu können:

-  Curcumin/DMSO, Myzel
-  Curcumin/micelliert, Myzel
-  Curcumin/DMSO, Konidien
-  Curcumin/micelliert, Konidien

Es zeigt sich, dass der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung beim micelliertem Curcumin für alle eingesetzten Konzentrationen auf dem gleichen Niveau bei 1 liegt. Die errechneten Effekte sind hierbei für die beiden Inokula Myzelfragmente und Konidien nahezu identisch.

Der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung bei Curcumin/DMSO zeigt hier bei den beiden niedrigsten Konzentrationen Cur 3/DMSO und Cur 4/DMSO einen ähnlichen Effekt wie das Curcumin/micelliert, während sich der Effekt des Cur 2/DMSO deutlich von dem Effekt des Cur 2/micelliert unterscheidet. Am deutlichsten ist der Unterschied des Effektes für die beiden Curcuminformen in der höchsten Konzentration. Hierbei nähert sich der Wert des Effektes für Curcumin/DMSO der 0.

Es zeigt sich kein nennenswerter Unterschied des Effektes abhängig vom Inokulum (Myzelfragmente bzw. Konidien).

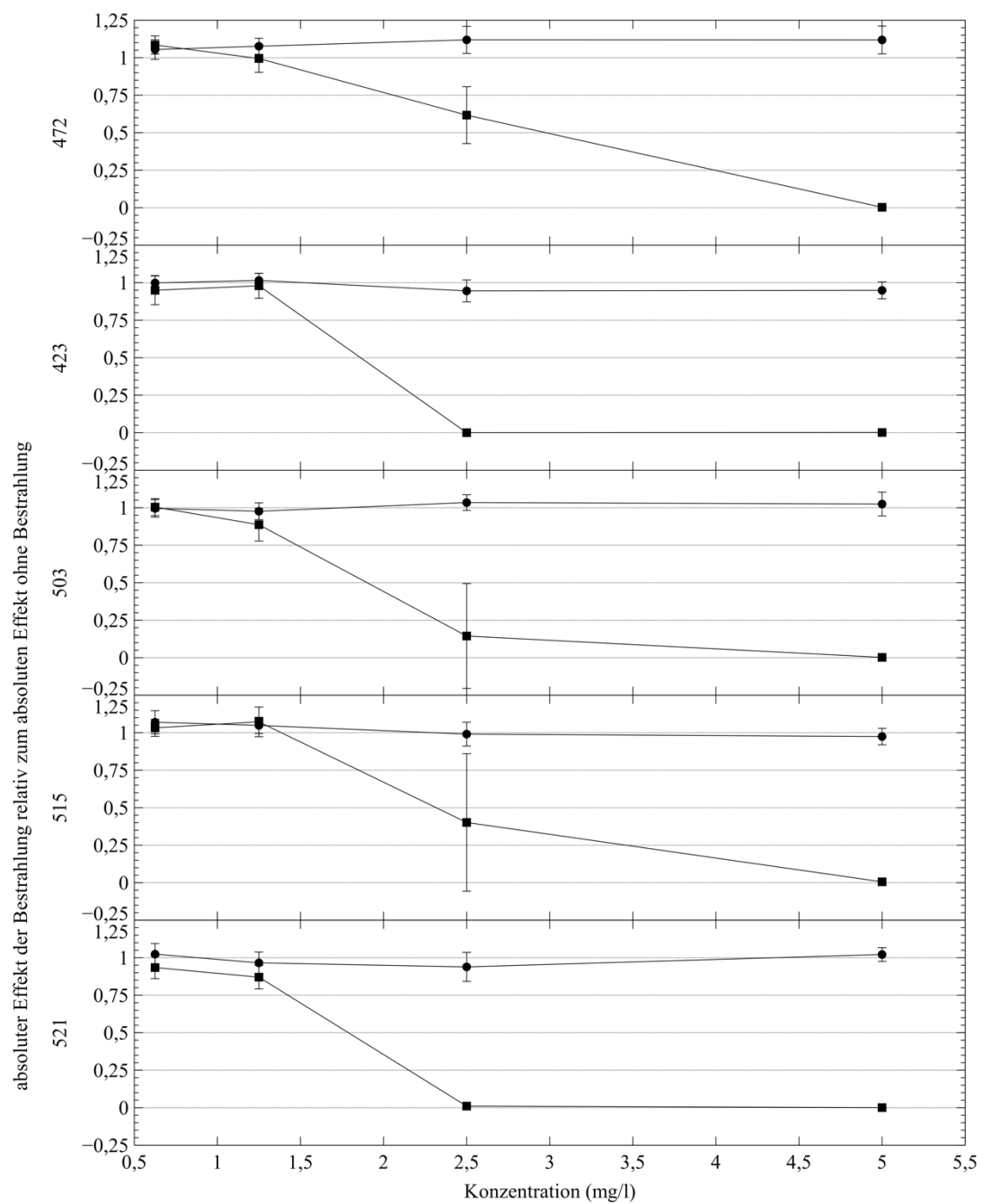




Abbildung 13: Curcumin/DMSO, Curcumin/micelliert, Stämme

Dargestellt ist der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung in Abhängigkeit der Curcuminkonzentrationen sowohl mit Curcumin/DMSO als auch mit Curcumin/micelliert. Der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung beinhaltet das Wachstum der einzelnen Stämme mit jeweils 3 Ansätzen. Dieser Effekt wurde für die unterschiedlichen Inokula

Konidien und Myzelfragmente gemittelt (n=6). Im Unterschied zu Abbildung 12 wurden die Stämme hierbei nicht gepoolt, sondern separat betrachtet, um mögliche stammabhängige Effekte darstellbar zu machen:

-  **Curcumin/DMSO**
-  **Curcumin/micelliert**

Die 5 Diagramme für die 5 verschiedenen *T. rubrum* Stämme zeigen für die Behandlung mit Curcumin/micelliert allesamt nahezu identische Effekte. Es kann bei allen eingesetzten Stämmen keine Wachstumshemmung beobachtet werden. Unter der Behandlung mit Curcumin/DMSO sind die Effekte auf das Dermatophytenwachstum für Cur1/DMSO, Cur 3/DMSO und Cur 4/ ebenfalls für alle Stämme identisch. Bei allen 5 Stämmen ist eine starke Wachstumshemmung nachweisbar. Dies gilt allerdings nicht für die Behandlung mit Cur 2/DMSO. Hier zeigen sich deutliche Unterschiede bei der Wachstumshemmung für die verschiedenen Stämme. Diese Beobachtung wurde bereits in Abbildung 9 näher untersucht.

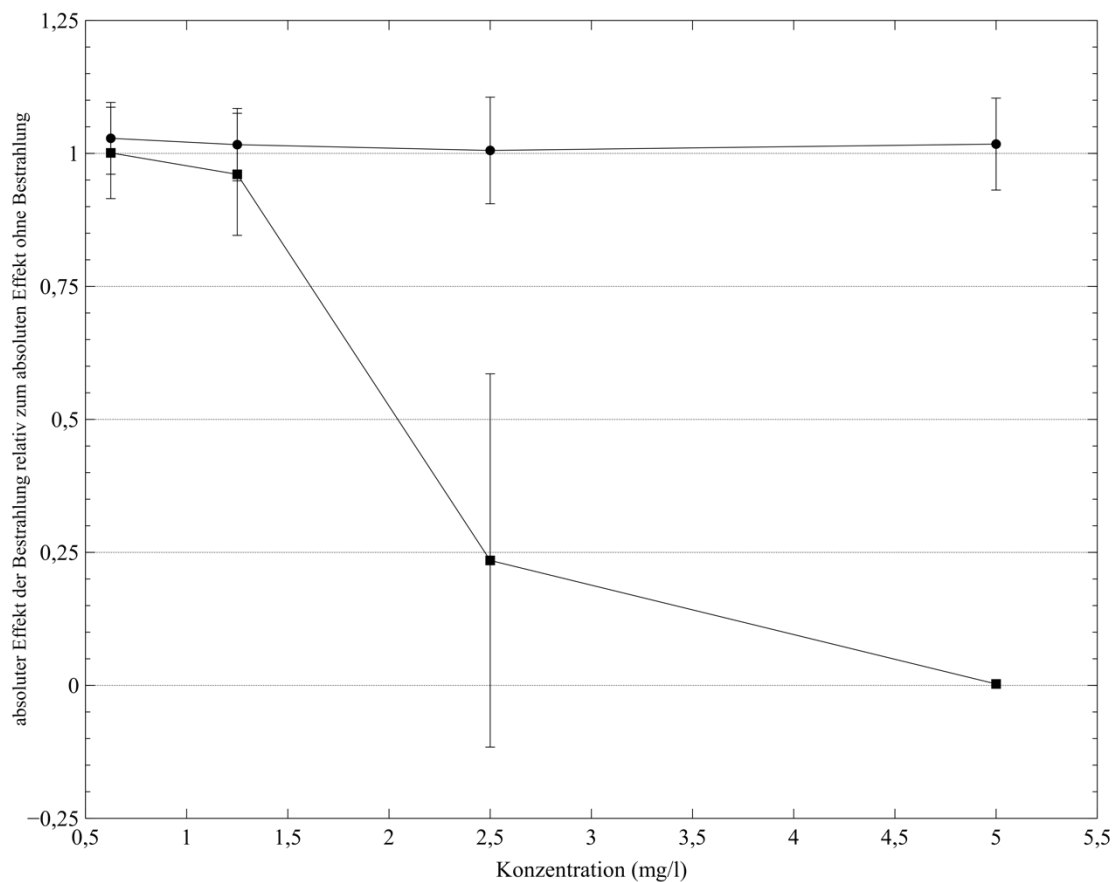


Abbildung 14: Curcumin/DMSO, Curcumin/micelliert

Dargestellt ist der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung in Abhängigkeit der Curcuminkonzentrationen sowohl für die Behandlung mit Curcumin/DMSO als auch für die Behandlung mit Curcumin/micelliert. Der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung wurde gepoolt für alle 5 Stämme mit jeweils 3 Ansätzen und beide Inokula berechnet (Konidien und Myzelfragmente) (n=30):

- Curcumin/DMSO
- Curcumin/micelliert

Der Unterschied des Effektes in Bezug auf die Behandlung mit Curcumin/DMSO bzw. Curcumin/micelliert zeigt sich am deutlichsten in der höchsten Konzentration. Hierbei

nähert sich der Wert des Effektes für Curcumin/DMSO dem Wert 0 an. Um nun zu überprüfen, ob dieser Effekt auch statistisch signifikant ist, wurden anschließend der F-Test und der ungepaarte t-Test durchgeführt. Beim Einsatz der geringeren Konzentration Cur 2 wurden stammabhängige Unterschiede der Hemmwirkung des Curcumins beobachtet. Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Tests ausschließlich für die höchste Konzentration Cur 1 angewendet, bei der keine stammabhängigen Unterschiede der Hemmwirkung des Curcumins beobachtet werden konnten.

3.2.6 Einfluss auf die Wachstumshemmung von *T.rubrum*-Stamm, Art des Inokulums und Curcumin, dargestellt anhand von F-Tests

Die Wachstumshemmung wurde definiert als der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung. Der jeweilige Einfluss auf die Wachstumshemmung, der von den Faktoren *T. rubrum* Stamm, Inokulum (Myzelfragmente oder Konidien) und Curcuminzubereitung (Curcumin/DMSO oder Curcumin/micelliert) ausgeht, wurde durch eine mehrfaktorielle ANOVA modelliert. Hierbei wurde ausschließlich der Einfluss der Faktoren auf die Wachstumshemmung unter dem Einsatz der höchsten Curcuminkonzentration Cur 1 betrachtet, da bereits bei der zweithöchsten Curcuminkonzentration Cur 2 eine Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Stamm beobachtet werden konnte. Der mögliche Einfluss eines jeden dieser Faktoren auf die Hemmung wurde mit Hilfe eines F-Tests zum Signifikanzniveau zu 0,01 evaluiert. Hierbei wird die Nullhypothese immer so formuliert, dass es keine Unterschiede der Mittelwerte der Faktorstufen bezüglich der Wachstumshemmung gibt. Die Alternativhypothese lautet entsprechend, dass es Unterschiede der Mittelwerte unter den jeweiligen Faktorstufen gibt.

F-Test für die Stämme ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5$) und Cur 1

Messwerte: $n = 60$

Faktorstufen: $q = 5$ (Anzahl der Stämme)

Nullhypothese: $\mathcal{H}_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_j = \dots = \mu_q$; Es gibt keinen Unterschied in den Mittelwerten der Faktorstufen

Freiheitsgrade im Zähler: $q - 1 = 4$

Freiheitsgrad im Nenner: $n - q = 55$

Testniveau / Signifikanzniveau: $\alpha = 0,01$

kritischer Wert (F-Verteilung): $x_{kritisch} = 3,68 \Rightarrow \bar{v} = [0; 3,68]; v = [3,68; \infty]$

Mittelwerte Faktorstufen:

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n_j} \sum_{i=1}^{n_j} x_{ji}; \bar{x}_{\alpha_1} \approx 0,56; \bar{x}_{\alpha_2} \approx 0,48; \bar{x}_{\alpha_3} \approx 0,51; \bar{x}_{\alpha_4} \approx 0,59; \bar{x}_{\alpha_5} \approx 0,51$$

Gesamtmittelwert aller Messwerte:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \approx 0,51$$

Streuung der Messwerte innerhalb der Faktorstufen (Mean Sum of Squares within):

$$MSS_w = \frac{1}{n - q} \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji} - \bar{x}_j)^2 \approx 0,28$$

Streuung der Messwerte zwischen den Faktorstufen (Mean Sum of Squares between):

$$MSS_b = \frac{1}{q - 1} \sum_{j=1}^q (\bar{x}_j - \bar{x})^2 \cdot n_j \approx 0,01$$

Teststatistik:

$$F_{emp} = \frac{MSS_b}{MSS_w} \approx 0,04 \in \bar{v}$$

$\Rightarrow F_{emp} < x_{kritisch}$; Die Nullhypothese kann zum Niveau $\alpha = 0,01$ beibehalten werden.

F-Test für die Inokula (β_1, β_2) und Cur 1

Messwerte: $n = 60$

Faktorstufen: $q = 2$ (Anzahl der Inokula; Myzel und Konidien)

Nullhypothese: $\mathcal{H}_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_j = \dots \mu_q$; Es gibt keinen Unterschied in den

Mittelwerten der Faktorstufen

Freiheitsgrade im Zähler: $q - 1 = 1$

Freiheitsgrad im Nenner: $n - q = 58$

Testniveau / Signifikanzniveau: $\alpha = 0,01$

kritischer Wert (F-Verteilung): $x_{kritisch} = 7,09 \Rightarrow \bar{v} = [0; 7,09]; v = [7,09; \infty]$

Mittelwerte Faktorstufen:

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n_j} \sum_{i=1}^{n_j} x_{ji}; \bar{x}_{\beta_1} \approx 0,51; \bar{x}_{\beta_2} \approx 0,49$$

Gesamtmittelwert aller Messwerte:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \approx 0,51$$

Streuung der Messwerte innerhalb der Faktorstufen (Mean Sum of Squares within):

$$MSS_w = \frac{1}{n - q} \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji} - \bar{x}_j)^2 \approx 0,27$$

Streuung der Messwerte zwischen den Faktorstufen (Mean Sum of Squares between):

$$MSS_b = \frac{1}{q - 1} \sum_{j=1}^q (\bar{x}_j - \bar{x})^2 \cdot n_j \approx 0,001$$

Teststatistik:

$$F_{emp} = \frac{MSS_b}{MSS_w} \approx 0,01 \in \bar{v}$$

$\Rightarrow F_{emp} < x_{kritisch}$; Die Nullhypothese kann zum Niveau $\alpha = 0,01$ beibehalten werden.

F-Test für die Zusätze (γ_1, γ_2) und Cur 1

Messwerte: $n = 60$

Faktorstufen: $q = 2$ (Anzahl der Zusätze; Curcumin/DMSO und Curcumin/micelliert)

Nullhypothese: $\mathcal{H}_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_j = \dots \mu_q$; Es gibt keinen Unterschied in den Mittelwerten der Faktorstufen

Freiheitsgrade im Zähler: $q - 1 = 1$

Freiheitsgrad im Nenner: $n - q = 58$

Testniveau / Signifikanzniveau: $\alpha = 0,01$

kritischer Wert (F-Verteilung): $x_{kritisch} = 7,09 \Rightarrow \bar{v} = [0; 7,09]; v = [7,09; \infty]$

Mittelwerte Faktorstufen:

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n_j} \sum_{i=1}^{n_j} x_{ji}; \bar{x}_{\gamma_1} \approx 0,003; \bar{x}_{\gamma_2} \approx 1,02$$

Gesamtmittelwert aller Messwerte:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \approx 0,51$$

Streuung der Messwerte innerhalb der Faktorstufen (Mean Sum of Squares within):

$$MSS_w = \frac{1}{n - q} \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji} - \bar{x}_j)^2 \approx 0,004$$

Streuung der Messwerte zwischen den Faktorstufen (Mean Sum of Squares between):

$$MSS_b = \frac{1}{q - 1} \sum_{j=1}^q (\bar{x}_j - \bar{x})^2 \cdot n_j \approx 15,45$$

Teststatistik:

$$F_{emp} = \frac{MSS_b}{MSS_w} \approx 4122 \in v$$

$\Rightarrow F_{emp} > x_{kritisch}$; Die Teststatistik liegt zum Niveau $\alpha = 0,01$ deutlich im Ablehnungsbereich.

Die Tests legen nahe, dass Unterschiede in der Wachstumshemmung bedingt durch verschiedene Stämme und Unterschiede in der Wachstumshemmung bedingt durch unterschiedliche Inokula in der Modellierung vernachlässigbar sind (jeweils F-Wert empirisch < kritischer Wert). Wie die vorherigen Abbildungen es bereits vorweggenommen haben und der obige Test dies formal bestätigt, ist der Unterschied in der Wachstumshemmung jedoch hoch signifikant vom Curcuminzusatz abhängig (F-empirisch > kritischer Wert).

Die Richtung und Stärke dieses Effektes wird im Folgenden mit Hilfe des ungepaarten Zweistichproben-t-Tests geschätzt.

3.2.7 Unterschied zwischen Curcumin/DMSO und Curcumin/micelliert bezüglich des absoluten Effektes der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung für die höchste eingesetzte Curcuminkonzentration Cur 1

Der t-Test kam zur Anwendung, um zu untersuchen, ob der Unterschied zwischen Curcumin/DMSO und Curcumin/micelliert bezüglich des absoluten Effektes der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung für die höchste eingesetzte Curcuminkonzentration Cur 1 statistisch signifikant ist. Hierbei wurde der Zweistichproben-t-Test für ungepaarte Stichproben angewendet, der den Effekt in den beiden Gruppen miteinander vergleicht. Es wurde ausschließlich der Effekt der Curcuminkonzentration Cur 1 betrachtet. Der t-Test wurde auf dem Signifikanzniveau 1% durchgeführt, was einem p-Wert von < 0,01 entspricht.

Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben (ungepaarter t-Test), Zusätze (γ_1 , γ_2) und Cur 1

Messwerte Cur 1/DMSO: $n_1 = 30$

Messwerte Cur 1/micelliert: $n_2 = 30$

Nullhypothese: $\mathcal{H}_0: \mu_1 - \mu_2 = \omega_0 = 0$; Es gibt keinen Unterschied zwischen den Mittelwerten von Cur 1/DMSO und Cur 1/micelliert.

Freiheitsgrade: $n_1 + n_2 - 2 = 58$

Testniveau / Signifikanzniveau: $\alpha = 0,01$

kritischer Wert (T-Verteilung):

$$x_t = 2,66 \Rightarrow v_1 = (-\infty; -2,66); \bar{v} = [-2,66; 2,66]; v_2 = (2,66; \infty)$$

Mittelwert Cur 1/DMSO:

$$\bar{x}^{(1)} = \frac{1}{n_1} \sum_{i=1}^{n_1} x_i^{(1)} \approx 0,00263$$

Mittelwert Cur 1/micelliert:

$$\bar{x}^{(2)} = \frac{1}{n_2} \sum_{i=1}^{n_2} x_i^{(2)} \approx 1,01754$$

Varianz Cur 1/DMSO:

$$s^{(1)*2} = \frac{1}{n_1 - 1} \sum_{i=1}^{n_1} (x_i^{(1)} - \bar{x}^{(1)})^2 \approx 0,00003$$

Varianz Cur 1/micelliert:

$$s^{(2)*2} = \frac{1}{n_2 - 1} \sum_{i=1}^{n_2} (x_i^{(2)} - \bar{x}^{(2)})^2 \approx 0,00747$$

Teststatistik:

$$t = \frac{\bar{x}^{(1)} - \bar{x}^{(2)} - \omega_0}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)s^{(1)*2} + n_2 - 1s^{(2)*2}}{n_1 + n_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \approx -64,21 \in v$$

$$P\text{-Wert} = 1,4 \cdot 10^{-55} < 0,0001$$

$\Rightarrow t < -x_t$; Die Nullhypothese muss zum Niveau $\alpha = 0,01$ verworfen werden.

Ergebnis t-Test

Die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied des Effektes von Cur 1/DMSO gegenüber Cur 1/micelliert gibt, kann nach Durchführung des Zweistichproben-t-Tests für ungepaarte Stichproben zum Signifikanzniveau 1% verworfen werden. Die Hemmung unter Cur 1/DMSO liegt bei nahezu 100% (x_1 liegt bei circa 2 Promille), während Curcumin 1/micelliert das Wachstum nicht hemmt ($x_2 \approx 100\%$). Der Unterschied des Effektes der beiden Curcuminformen liegt also bei circa 100 Prozentpunkten ($x_2 - x_1 = 1.017 - 0.002 \approx 1$).

3.2.8 Mikroskopische Darstellung der Myzeldichte von *T. rubrum* unter dem Einfluss von Cur 1/micelliert, Cur 1/DMSO und Fluconazol jeweils nach erfolgter Bestrahlung (20 J/cm²) an Tag 4 (104 Stunden nach Bestrahlung)

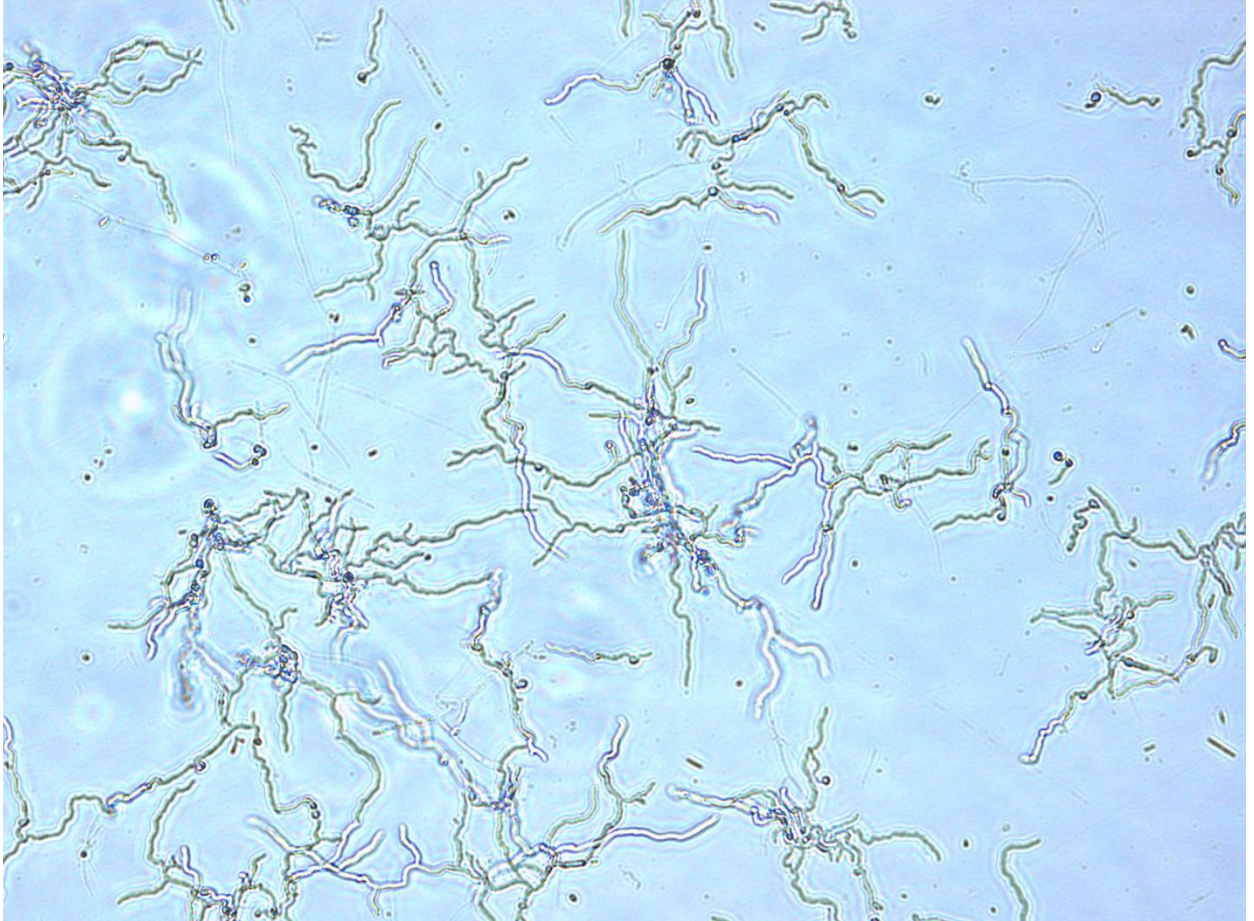


Abbildung 15: *T. rubrum* (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 4, Myzel unter Cur 1/micelliert (Curcumin micelliert 5mg/l in Phosphatpuffer)

Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.

An Tag 4 (104 Stunden nach erfolgter Bestrahlung) der Versuchsreihe ist unter Cur 1/micelliert eine Myzelbildung zu erkennen.

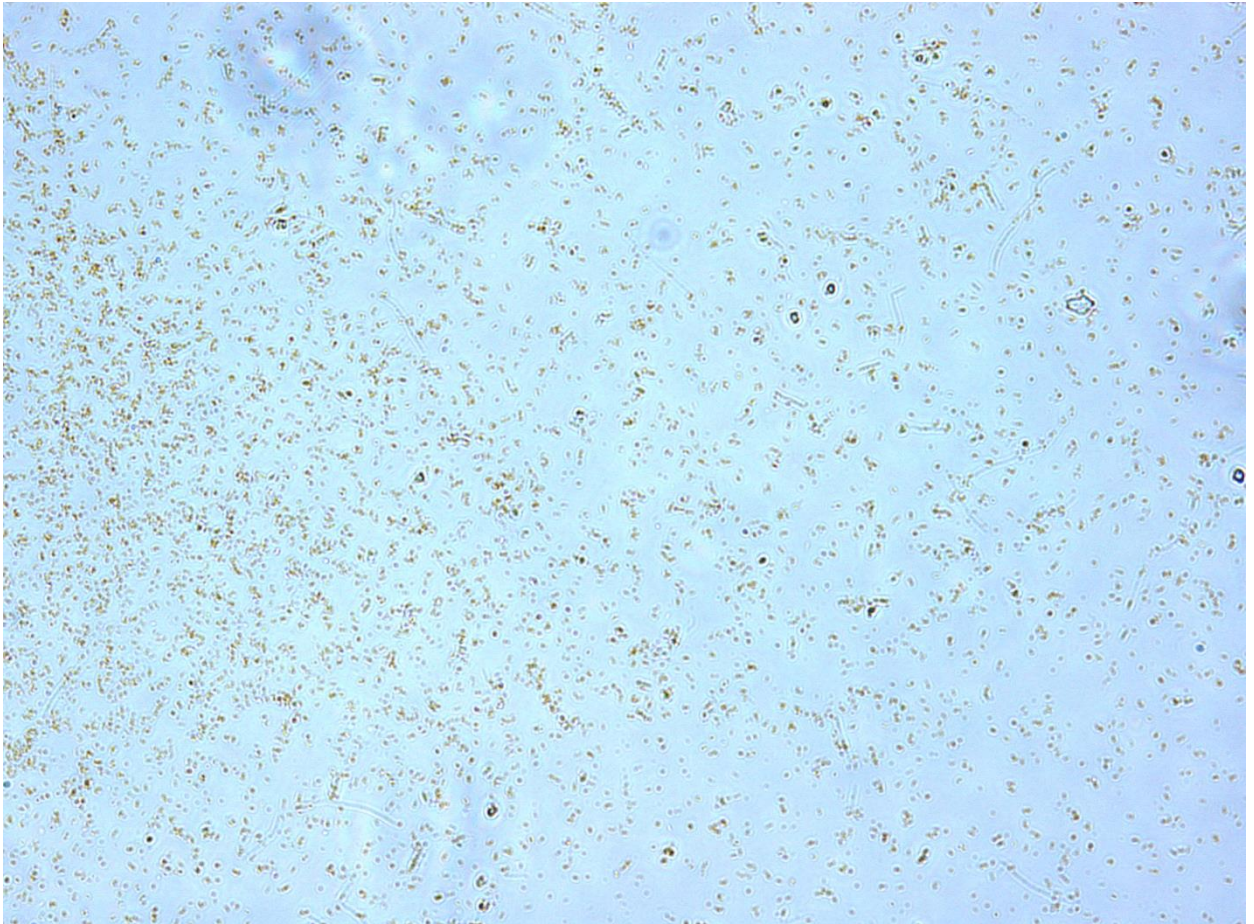


Abbildung 16: *T. rubrum* (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 4, Myzel unter Cur 1/DMSO (Curcumin 5mg/l in 1% DMSO/Puffer)

Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die vorliegenden Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Stammlösungen, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzel- bzw. Konidiensuspension zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.

An Tag 4 (104 Stunden nach erfolgter Bestrahlung) der Versuchsreihe ist unter Cur 1/DMSO keine Myzelbildung zu erkennen.



Abbildung 17: *T. rubrum* (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 4, Myzel unter Fluc (Fluconazol 0,5mg/ml in Aqua destillata)

Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.

An Tag 4 (104 Stunden nach erfolgter Bestrahlung) der Versuchsreihe ist unter der Behandlung des Myzels mit Fluconazol keine beginnende Aussprossung des Myzels zu erkennen.

3.2.9 Mikroskopische Darstellung der Myzeldichte von *T. rubrum* unter dem Einfluss von Cur 1/micelliert, Cur 1/DMSO und Fluconazol jeweils nach erfolgter Bestrahlung (20 J/cm²) an Tag 9 (216 Stunden nach Bestrahlung)

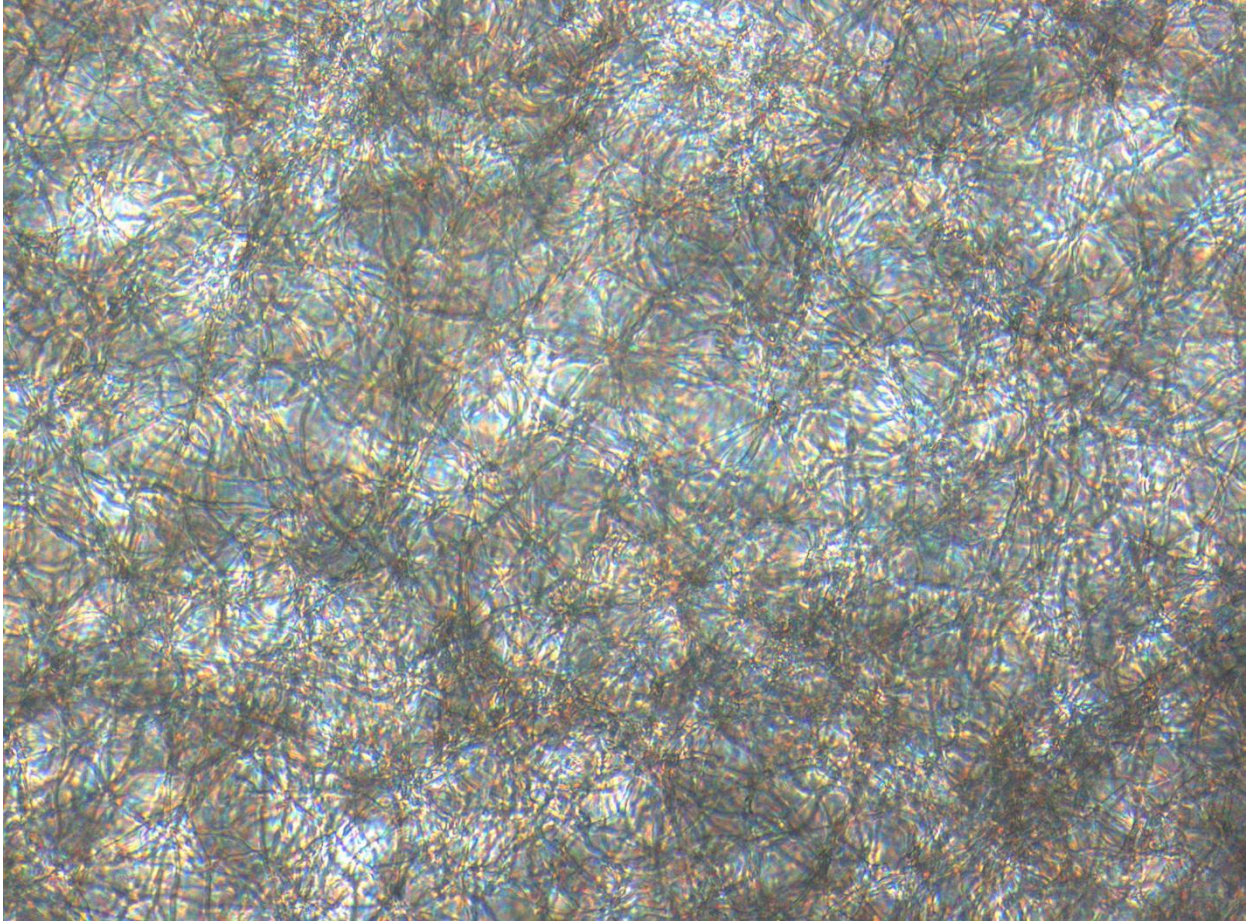


Abbildung 18: *T. rubrum* (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 9, Myzel unter Cur 1/micelliert (Curcumin micelliert 5mg/l in Phosphatpuffer)

Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.

Im bestrahlten Versuchsansatz zeigte sich an Tag 9 (216 Stunden nach erfolgter Bestrahlung) unter Cur 1/micelliert mikroskopisch eine dichte Myzelbildung.

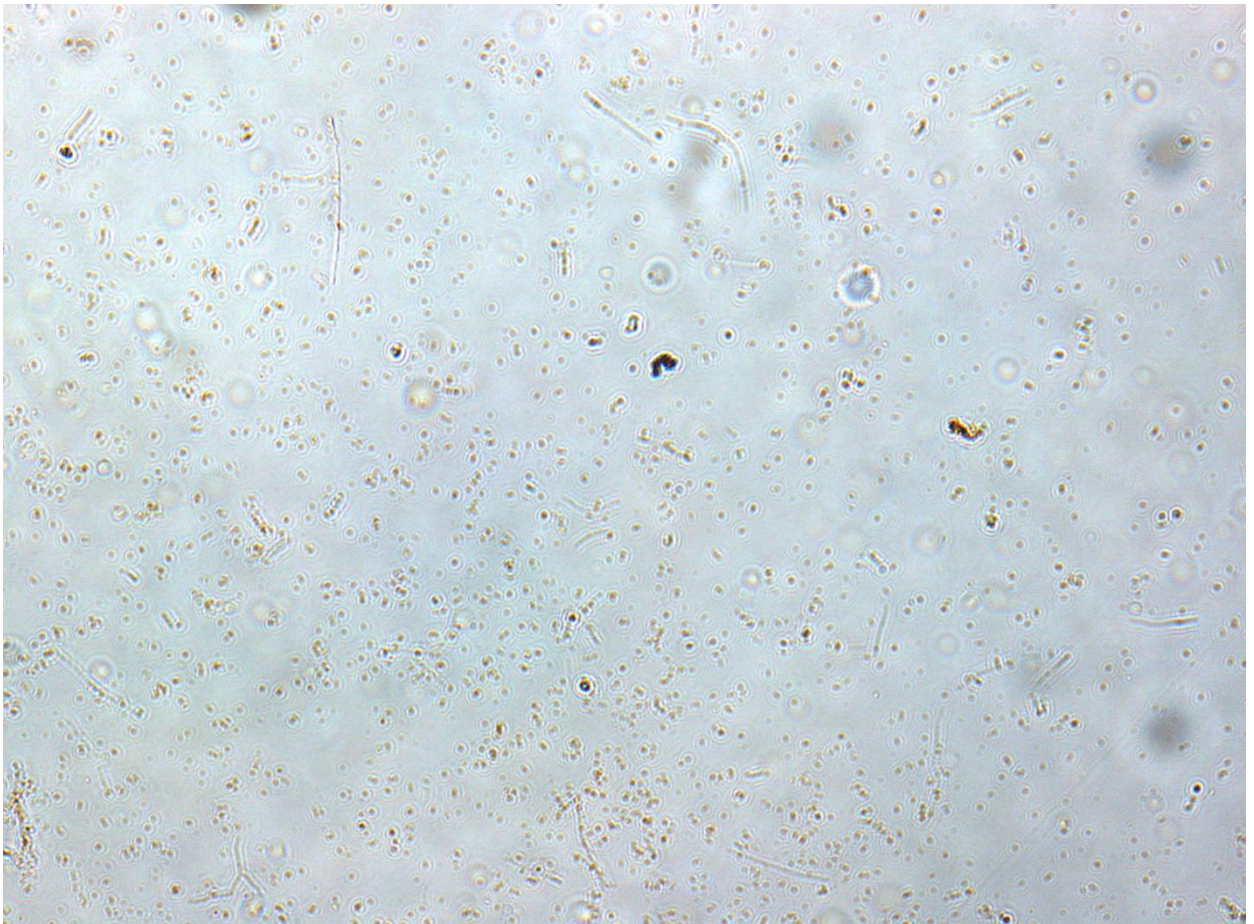


Abbildung 19: *T. rubrum* (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 9, Myzel unter Cur 1/DMSO (Curcumin 5mg/l in 1% DMSO/Puffer)

Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.

Im bestrahlten Versuchsansatz zeigte sich an Tag 9 (216 Stunden nach erfolgter Bestrahlung) unter Verwendung des Cur 1/DMSO kaum Myzelwachstum.

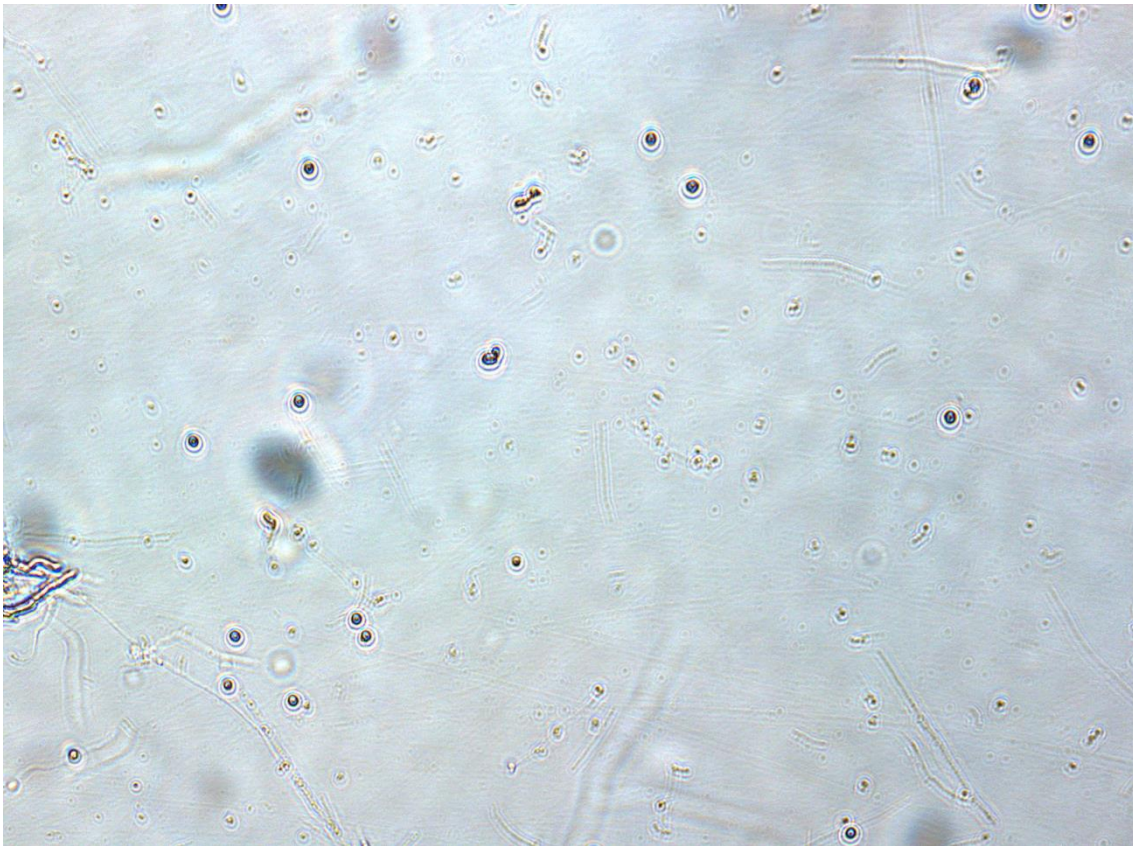


Abbildung 20: *T. rubrum* (Vergrößerung 1:100), bestrahlter Versuchsansatz, Tag 9, Myzel unter Fluc (Fluconazol 0,5mg/ml in Aqua destillata)

Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Kammern der Mikrotiterplatten zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Diese entsprechen $\frac{1}{4}$ der Konzentration der Lösungen vor Inokulation, da es durch die Zugabe von 100 μ l Nährmedium sowie 50 μ l Myzelfragmenten bzw. Konidien zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kommt.

Im bestrahlten Versuchsansatz zeigte sich an Tag 9 (216 Stunden nach erfolgter Bestrahlung) unter der Behandlung von Fluconazol keine Myzelbildung von *T. rubrum*.

3.2.10 Makroskopische Darstellung des Wachstums von *T. rubrum* unter dem Einfluss von Cur 1/DMSO, Cur 2/DMSO und Fluconazol jeweils nach erfolgter Bestrahlung (20 J/cm²), Tag 8



Abbildung 21: Myzelwachstum der gepoolten mit Fluconazol behandelten Konidien, Tag 8

Nach 8 Tagen Inkubation ist makroskopisch nach Ausstrich der gepoolten Suspensionen aus den mit Konidien, Sabouraud-Boullion und Fluconazol beschickten und bestrahlten Kavitäten (siehe Abb. 4: Reihe H, Spalte 7-9) auf Dermatopyhtenagar ein deutliches Wachstum zu beobachten.



Abbildung 22: Myzelwachstum des gepoolten mit Fluconazol behandelten Myzels, Tag 8

Nach 8 Tagen Inkubation ist makroskopisch ein deutliches Wachstum der gepoolten mit Myzel, Sabouraud und Fluconazol beschickten und bestrahlten Kavitäten (siehe Abb. 4: Reihe H, Spalte 1-3), die auf Dermatophytenagar ausgestrichen wurden, zu beobachten. Es können makroskopisch keine deutlichen Wachstumsunterschiede zwischen den gepoolten Ausstrichen der Ansätze mit Myzelfragmenten und Konidien festgestellt werden.



Abbildung 23: Myzelwachstum der gepoolten mit Cur 2/DMSO behandelten Konidien, Tag 8

Nach 8 Tagen Inkubation ist makroskopisch ein deutliches Wachstum der gepoolten mit Konidien, Sabouraud und Cur 2/DMSO beschickten und bestrahlten Kavitäten (siehe Abb. 4: Reihe B, Spalte 10-12), die auf Dermatopyhtenagar ausgestrichen wurden, zu beobachten.

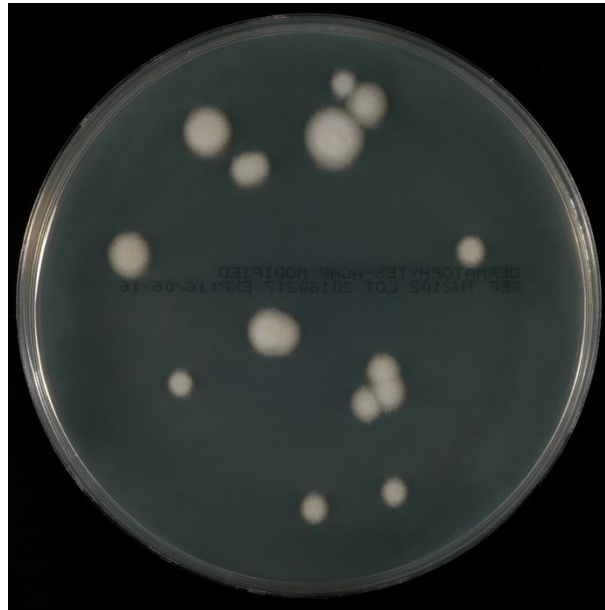


Abbildung 24: Myzelwachstum des gepoolten mit Cur 2/DMSO behandelten Myzels, Tag 8

Nach 8 Tagen Inkubation ist makroskopisch ein deutliches Wachstum der gepoolten mit Myzel, Sabouraud und Cur 2/DMSO beschickten und bestrahlten Kavitäten (siehe Abb. 4: Reihe B, Spalte 4-6), die auf Dermatopyhtenagar ausgestrichen wurden, zu beobachten. Es können makroskopisch keine deutlichen Wachstumsunterschiede zwischen dem gepoolten Myzel und den gepoolten Konidien festgestellt werden.

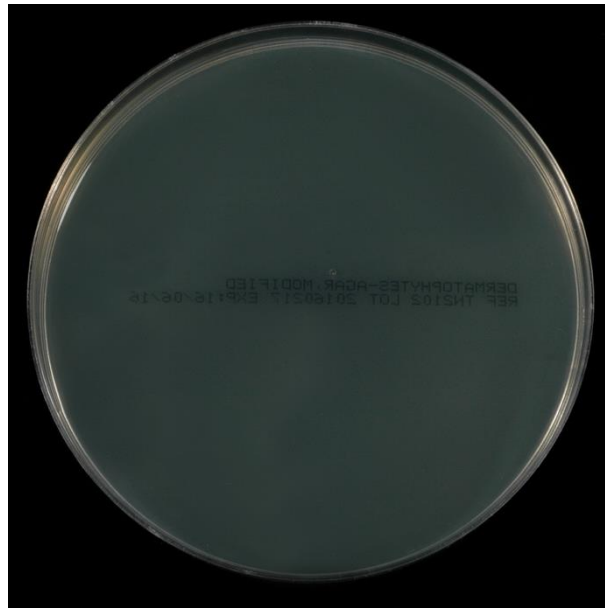


Abbildung 25: Fehlendes Myzelwachstum der gepoolten mit Cur 1/DMSO behandelten Konidien, Tag 8

Nach 8 Tagen Inkubation ist makroskopisch kein Wachstum der gepoolten mit Konidien, Sabouraud und Cur 1/DMSO beschickten Kavitäten (siehe Abb. 4: Reihe A, Spalte 10-12), die auf Dermatophytenagar ausgestrichen wurden, zu beobachten.

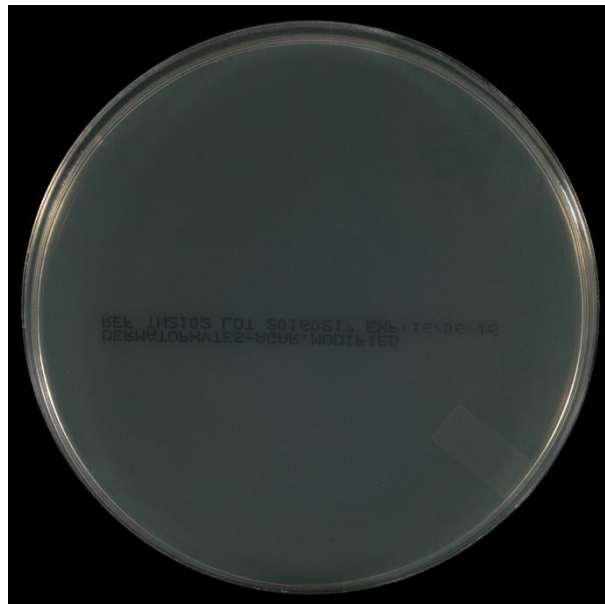


Abbildung 26: Fehlendes Myzelwachstum des gepoolten mit Cur 1/DMSO behandelten Myzels, Tag 8

Nach 8 Tagen Inkubation ist makroskopisch kein Wachstum der gepoolten mit Myzel, Sabouraud und Cur 1/DMSO beschickten Kavitäten (siehe Abb. 4: Reihe A, Spalte 4-6), die auf Dermatophytenagar ausgestrichen wurden, zu beobachten.

4 Besprechung der Ergebnisse (Diskussion)

4.1 Effekt alleiniger Belichtung auf das Wachstumsverhalten von *T. rubrum*

Der Einfluss von Licht auf das Wachstum von Dermatophyten wurde bereits in einigen Studien untersucht (Cronin et al. 2014; Dai et al. 2008; Moorhead et al. 2016), da eine potentielle, alleinige Phototherapie eine kostengünstige und nebenwirkungsarme Alternative zur bisherigen antimykotischen Therapie darstellen würde. So konnte in einer *in vitro* Untersuchung (Cronin et al. 2014) eine signifikante Wachstumshemmung des Dermatophyten *T. rubrum* nach einer Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 280 nm und einer Lichtdosis von 3,1 J/cm² beobachtet werden. Dieser Effekt war dosisabhängig. So kam es bei gleicher Wellenlänge, aber geringerer Lichtdosis zu einem Anwachsen der Dermatophyten innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 7 Tagen, sodass hier von einem fungistatischen Effekt, der weitere Bestrahlungseinheiten erfordern würde, gesprochen werden kann. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde außerdem Licht des Wellenlängenbereichs bis 365 nm eingesetzt. Dabei konnte unter Einsatz von Licht im Bereich von 320-365 nm keine signifikante Wachstumshemmung beobachtet werden. Zudem wurde die Lichttransmission von Zehennägeln *in vitro* gemessen und hier konnte erst ab einer Wellenlänge von 317 nm eine Lichttransmission beobachtet werden. Eine weitere aktuelle *in vitro* Studie (Moorhead et al. 2016) untersuchte mögliche wachstumshemmende Effekte durch die Belichtung mit blauvioletterem Licht der Wellenlänge 405 nm auf *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* und *Aspergillus niger*. In dieser Studie wurden sowohl Konidien von *Trichophyton spp.* auf Agarplatten als auch Hyphe von *Trichophyton spp.* in Suspensionen untersucht. Unter einer Lichtdosis von 126 J/cm² kam es bei den Konidien auf den Agarplatten auch nach einem Beobachtungszeitraum von 10 Tagen zu einer deutlichen Reduktion der Koloniebildenden Einheiten (KBE) gegenüber der Kontrollgruppe ohne Bestrahlung und unter einer Lichtdosis von 504 J/cm² kam es sogar zum kompletten Wachstumsstop. Auch das Wachstum der Hyphen in der Suspension wurde unter den eingesetzten Lichtdosen von 360 J/cm², 720 J/cm² und 1440 J/cm² komplett gestoppt. Die Autoren vermuten als Ursache für die fun-

gistische bzw. fungizide Wirkung des blauen Lichtes, dass endogene Porphyrine innerhalb der Pilzzellen die Photonen absorbieren. Dies wiederum würde dann die Phase 1 und Phase 2 Reaktionen auslösen (siehe Kapitel 1.6 und 1.7), die schließlich zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen führen würden. Diese hochreaktiven Verbindungen stören die intrazelluläre Homöostase und führen schließlich zum Zelltod. Diese Ergebnisse klingen zunächst sehr vielversprechend hinsichtlich einer möglichen Phototherapie von Dermatophyten, allerdings konnte ein alleiniger Effekt durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht der Wellenlänge 420 nm auf das Dermatophytenwachstum in meiner Arbeit nicht beobachtet werden. Allerdings wurde in meiner Untersuchung mit einer deutlich geringeren Lichtdosis von lediglich 20 J/cm² im Vergleich zu Moorhead et al. gearbeitet. Da die in der Studie von Moorhead et al. beobachtete Phototoxizität dosisabhängig war und unter der Lichtdosis von 126 J/cm² keine komplette Hemmung stattgefunden hatte, ist durchaus anzunehmen, dass eine deutliche Erhöhung meiner Lichtdosen ebenfalls zur Hemmung des Dermatophytenwachstums führen würde. Dieser Effekt war in meiner Untersuchung jedoch nicht erwünscht, da der synergistische Effekt von Licht und Curcumin auf das Wachstum der Dermatophyten untersucht werden sollte und ein bereits alleiniger phototoxischer Effekt einen Konfundierungseffekt dieser Untersuchungsergebnisse zur Folge gehabt hätte. Anhand der hier zitierten Studien scheint eine alleinige Phototherapie zur Behandlung der Tinea oder Onychomykose durchaus eine mögliche Option darzustellen. Es ist davon auszugehen, dass eine kurzzeitige Anwendung von blauem Licht mit oder ohne Einsatz eines Photosensibilisators als sicher einzustufen ist. Allerdings sollten Lichtdosen über 60 J/cm² vermieden werden, da unter diesen Lichtdosen zytotoxische Effekte auf menschliche Keratinozyten und Endothelzellen beobachtet wurden (Liebmann et al. 2010). Zudem müssen weitere klinische Studien erfolgen und insbesondere potentielle Langzeiteffekte wie verstärkte Hautalterung oder Induktion von Hautkrebs untersuchen. Um die hohen Lichtdosen bzw. die langen Belichtungszeiten zu reduzieren und somit für den Patienten angenehmer und sicherer gestalten zu können, ist eine für den Patienten gut verträgliche Photochemotherapie eine weitere Option. Curcumin als geeigneten Photochemosensibilisator näher zu untersuchen, ist hierbei eine wichtige Aufgabe weiterer Studien.

4.2 Effekt des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) auf das Wachstumsverhalten von *T. rubrum*

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein häufig eingesetztes Lösungsmittel, das dazu dient, die Penetrationsfähigkeit verschiedener topisch wirkender Substanzen zu erhöhen und damit deren Effekt zu verstärken (Capriotti und Capriotti 2012: 25). Um nun einen möglichen von DMSO ausgehenden wachstumshemmenden Effekt auf Dermatophyten nicht fälschlicherweise auf Curcumin zurückzuführen, wurde in dieser Versuchsreihe auch der alleinige Einsatz von DMSO und dessen Einfluss auf das Wachstum von *T. rubrum* untersucht. Randhawa (Akram Randhawa 2008: 125–128) konnte in einer *in vitro* Versuchsreihe eine signifikante Wachstumshemmung auf Arthrosporen von *T. mentagrophytes* und Zellen von *C. albicans* bei DMSO Konzentrationen von 10%, 7,5%, 5% und 2,5% gelöst in Aqua destillata beobachten. Hierbei handelte es sich um einen dosisabhängigen Effekt der Wachstumshemmung. Bei der niedrigsten eingesetzten DMSO Konzentration von 1,25% konnte keine signifikante Wachstumshemmung von *T. mentagrophytes* und *C. albicans* beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind kompatibel mit den Ergebnissen meiner Versuchsreihe, in der DMSO in einer Konzentration von 1% gelöst in Phosphatpuffer eingesetzt wurde und keinen signifikant wachstumshemmenden Effekt auf *T. rubrum* ausübte. Ebenfalls passen die Beobachtungen von Brasch et al. zu den hier erhobenen Ergebnissen, die den Einfluss von 2% DMSO/Aqua destillata auf das Wachstum von 6 Dermatophytenarten, darunter auch *T. rubrum*, untersuchten. Hierbei konnte kein wachstumshemmender Effekt von DMSO, weder in bestrahltem noch in unbestrahltem Zustand, nachgewiesen werden (Brasch et al. 2017).

4.3 Wasserlöslichkeit und Lichtempfindlichkeit der beiden unterschiedlichen Curcuminformulierungen

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden zwei unterschiedliche Curcuminformulierungen eingesetzt, die hinsichtlich verschiedener Eigenschaften wie ihrer Wasserlöslichkeit, ihrer Lichtempfindlichkeit und ihrer wachstumshemmenden Wirkung auf den Dermatophyten *T. rubrum* untersucht wurden. Das Curcuminpulver (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde in dem von Brasch et al. erprobten Verfahren in

DMSO und Phosphatpuffer gelöst und auf 100°C erhitzt, um eine makroskopisch vollständige Lösung des Curcumins zu erreichen. Demgegenüber wurde das micellierte Curcumin (NovaSol®Curcumin, AQUA NOVA AG, Darmstadt, Deutschland) nicht in DMSO, sondern ausschließlich in Phosphatpuffer gelöst und auch nicht auf 100°C erhitzt, sondern lediglich auf 56°C. Makroskopisch lagen beide Curcuminlösungen bei diesen Temperaturen vollständig gelöst vor. Da die von mir hergestellten Curcuminlösungen nicht mikroskopisch kontrolliert wurden, ist allerdings nicht auszuschließen, dass geringe Mengen des Curcumins ungelöst verblieben sind. Makroskopisch waren beide Curcuminlösungen homogen transparent, unterschieden sich jedoch geringfügig in ihrem Gelbfarbton. Nach der Bestrahlung konnte ein deutliches Abblassen der mit Curcumin befüllten Kavitäten beobachtet werden. Dieser Effekt spricht für eine photodynamische Aktivierung des Curcumins und war bei beiden Curcuminformen ähnlich ausgeprägt. Um eine unerwünschte Lichtexposition vor der Inokulation und damit einhergehendem potentiellen Wirkverlust zu vermeiden, wurde während des Arbeitsprozesses und der Lagerung streng auf Lichtschutz des Curcumins geachtet. Dieser wurde mit Hilfe von lichtundurchlässiger Aluminiumfolie und lichtundurchlässigen Laborutensilien realisiert.

4.4 Effekte von unbelichtetem Curcumin auf das Wachstum von *T. rubrum*

Bereits im Jahr 1995 untersuchten Apisariyakul et al. in einer *in vitro* Versuchsreihe die Wirkung von Curcumaöl und auch von Curcumin auf das Wachstum verschiedener Dermatophyten, darunter auch *T. rubrum*, sowie auch auf Schimmel- und Hefepilze. Sie extrahierten sowohl das Curcumaöl als auch das reine Curcumin aus der Wurzel der *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*). Interessanterweise konnten sie für die Behandlung sowohl der Dermatophyten als auch der Schimmelpilze mit Curcumaöl eine deutliche Wachstumshemmung feststellen, während das reine Curcumin keine Effekte auf das Wachstum ausübte. Die getesteten *Candida* spp. zeigten weder ein Ansprechen auf die Behandlung mit Curcumaöl noch auf die Behandlung mit reinem Curcumin (Apisariyakul et al. 1995). Auch in einer späteren *in vitro* Studie, in der die Effekte verschiedener aus *Curcuma longa* gewonnener Komponenten auf ihre wachstumshemmende Wirkung auf verschiedene Dermatophytenstämme untersucht wurden, konnte für Curcumaöl eine

antimykotische Wirkung beobachtet werden (Wuthi-udomlert et al. 2000). In der Untersuchung von Brasch et al., in der Curcumin in DMSO gelöst in einer maximalen Endkonzentration von 2,7 mg/l (bezogen auf das Kammervolumen von 200 µl der 96-Well Mikrotiterplatten) eingesetzt wurde, konnten heterogene Effekte auf das Dermatophytenwachstum beobachtet werden. Während für *T. interdigitale* und *M. gypseum* eine signifikante Wachstumshemmung nach vier Tagen Beobachtungszeitraum festgestellt werden konnte, die allerdings der Wachstumshemmung von Fluconazol unterlegen war, zeigten die weiteren untersuchten Dermatophytenstämme, unter anderem *T. rubrum*, keine relevante Wachstumshemmung (Brasch et al. 2017). Diese Erkenntnisse entsprechen meinen Versuchsergebnissen, in denen kein wachstumshemmender Effekt auf die Dermatophyten durch Zugabe von Curcumin ohne anschließende Belichtung festgestellt werden konnte. Dies gilt sowohl für die Zugabe von in DMSO gelöstem Curcumin als auch für die Zugabe von micelliertem Curcumin.

4.5 Effekte von photodynamisch aktiviertem Curcumin auf das Wachstum von *T. rubrum*

Die bereits von Brasch et al. berichteten Ergebnisse (Brasch et al. 2017), dass die Curcuminzubereitung in Form von Curcuminpulver gelöst in DMSO nach Photoaktivierung einen starken wachstumshemmenden Effekt auf Dermatophyten ausübte, konnten in meiner Untersuchung bestätigt werden. Die Methodik der Untersuchungen von Brasch et al. war nicht ganz identisch zu der von mir verwendeten Methodik. Unterschiede waren zum einen eine jeweils andere Lichtquelle; während Brasch et al. UV-Licht der Wellenlänge 367 nm verwendeten, wurde in meiner Untersuchung blaues Licht der Wellenlänge 420 nm verwendet, das dem Absorptionsmaximum von Curcumin noch näher ist (Priyadarsini 2014; 20095). Auch die eingesetzte Lichtdosis unterschied sich; Brasch et al. verwendeten 5 J/cm², während in meiner Versuchsreihe mit 20 J/cm² bestrahlt wurde. Die von mir verwendete deutlich höhere Lichtdosis des blauen Lichtes ist im Rahmen einer photodynamischen Therapie beim Menschen, wie in Kapitel 1.6 „Optische Strahlung“ bereits dargestellt, als unbedenklich einzustufen. Ebenso gab es noch Unter-

schiede in der Dosierung der Curcuminlösungen. Bei Brasch et al. wurden die eingesetzten Curcumindosierungen von 5,4 mg/l bis 0,6 mg/l gelöst in 2% DMSO nach der Bestrahlung noch um den Faktor 2 verdünnt durch die Zugabe von Sabouraudbouillon. In meiner Versuchsreihe wurden Curcumindosierungen in einer Endkonzentration von 5mg/l bis 0,625 mg/l gelöst in 1% DMSO bereits zum Zeitpunkt der Bestrahlung eingesetzt. Eine Verdünnung durch Zugabe weiterer Substanzen fand nicht statt. In der Untersuchung von Brasch et al. konnte für die Dosierungen von 5,4 mg/l, 1,8 mg/l und 0,6 mg/l eine signifikante Hemmung des Wachstums von *T. rubrum* nach einem Beobachtungszeitraum von 4 Tagen beobachtet werden. In meiner Untersuchung zeigte sich nach 5 Tagen eine deutliche Wachstumshemmung unter den Dosierungen von 5 mg/l und 2,5 mg/l. Nach 9 Tagen Beobachtung kam es unter der Dosierung von 2,5 mg/l zum Anwachsen von zwei der insgesamt fünf untersuchten *T. rubrum* Stämme. Man kann das verzögerte Anwachsen unter der Dosierung von 2,5 mg/l als eine lediglich fungistatische Wirkung des photodynamisch aktivierten Curcumins und das Ausbleiben des Dermatophytenwachstums unter der Dosierung von 5 mg/l als einen fungiziden Effekt bezeichnen. Diese Beobachtung wird durch den von mir durchgeführten Anschlussversuch ebenfalls bestätigt. In dieser anschließenden makroskopischen Beobachtungsreihe des Dermatophytenwachstums konnte nach einigen Tagen ein erneutes Anwachsen der gepoolten, auf Dermatophytenagarplatten ausgestrichenen Inokula nach Behandlung mit 2,5 mg/l Curcumin in DMSO beobachtet werden. Die ausgestrichenen, gepoolten Inokula, die mit 5 mg/l Curcumin in DMSO behandelt und bestrahlt worden waren, zeigten hingegen keine Myzelbildung nach 8 Tagen Inkubation auf den Agarplatten. Die Ursache für das verzögerte Anwachsen der beiden *T. rubrum* Stämme könnte in einer erworbenen Resistenz liegen, unter der es durch die von Curcumin verursachte ROS Akkumulation zu einer Hochregulierung verschiedener Gene zu verbesserten Abwehrmechanismen gegenüber dem antimykotischen Wirkstoff kam (Martinez-Rossi et al. 2018).

Den Ergebnissen, die für eine von photoaktiviertem mit DMSO gelösten Curcumin ausgehende starke Wachstumshemmung auf Dermatophyten sprechen, stehen allerdings die ausbleibende Wachstumsinhibition des photoaktivierten micellierten Curcumins gegenüber. In keiner der von mir eingesetzten Dosierungen konnte ein fungistatischer oder fungizider Effekt des micellierten Curcumins beobachtet werden. Dagegen konnte Curcumin in Nanopartikeln, beispielsweise wie von Baltazar et al. (Baltazar et al. 2015)

eingesetzt, in den Dosierungen von 10 mg/l und 1 mg/l und unter der Lichtdosis von 10 J/cm² das Wachstum von *T. rubrum* in einer *in vitro* Studie signifikant hemmen. Baltazar et al. testeten ebenfalls Curcumin in Pulverform gelöst in DMSO und konnten identische Effekte der beiden Curcuminformulierungen beobachten. Sie nahmen an, dass das veränderte Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu Gunsten der Oberfläche die Interaktion des in Nanopartikel verkapselten Curcumins mit *T. rubrum* verstärken und so die apoptotische Wirkung erhöhen könne.

Warum das von mir verwendete micellierte Curcumin keinerlei hemmenden Effekt auf das Wachstum von *T. rubrum* ausüben konnte, bleibt zu klären. Eine a priori Resistenz der verwendeten Dermatophyten gegenüber dem Wirkstoff Curcumin kann ausgeschlossen werden, da sich die gleichen Dermatophyten für eine Behandlung mit Curcumin in DMSO gelöst empfänglich zeigten und sich nach erfolgter Belichtung in ihrem Wachstum hemmen ließen. Eine weitere Erklärung für die fehlende antimykotische Wirkung des micellierten Curcumins wäre, dass die maximale Lichtabsorption der micellierten Curcuminform in einem anderen Wellenlängenbereich stattfindet als in dem von mir verwendeten Licht, denn wie Liu et al. (Liu et al. 2016: 63016) feststellen konnten, hängt der Absorptionsbereich von Curcumin auch davon ab, in welchem Medium gelöst bzw. an welche Moleküle gebunden es vorliegt. So zeigten Liu et al., dass das Absorptionsmaximum für Curcumin gelöst in DMSO und in Form einer Mikroemulsion bei 430 nm liegt. Da in der von mir durchgeführten Versuchsreihe nach erfolgter Bestrahlung der Mikrotiterplatten mit Licht der Wellenlänge 420 nm die Farbintensität sowohl des in DMSO gelösten Curcumins als auch des micellierten Curcumins deutlich reduziert war, ist von einer Photoaktivierung beider Curcuminformen auszugehen. Eine nicht stattgefundene Photoaktivierung des micellierten Curcumins als Erklärung für die fehlende antimykotische Wirkung ist daher nicht anzunehmen. Vielmehr ist es denkbar, dass die veränderte Galenik des Curcumins in Form einer Micellenstruktur die Interaktion des Curcumins mit der Zellwand der Dermatophyten so veränderte, dass das Curcumin nicht in die Pilzzelle eindringen und dort seine Wirkung entfalten oder schädigende Effekte an der Zellwand ausüben konnte.

4.6 Empfindlichkeit von Myzel und Konidien gegenüber den eingesetzten Curcuminformen

In dieser Versuchsreihe wurde erstmals der wachstumshemmende Effekt einer Photochemotherapie mit Curcumin sowohl auf die Konidien als auch auf Myzelfragmente von *T. rubrum* untersucht. Hierbei konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Wachstums- hemmung der Konidien bzw. des Myzels festgestellt werden. Frühere Studien unter- suchten bisher nur die Effekte der Photochemotherapie mit Curcumin auf die Konidien der Dermatophyten. Die Beobachtung, dass sich sowohl die Konidien als auch das Myzel gleich empfindlich zeigten, ist sehr relevant bezüglich einer möglichen Photochemothe- rapie der Tinea, da Dermatophyten sich im Stratum corneum der Haut über die Bildung von Myzel ausbreiten (Brasch 2010: 781). Das Myzel stellt daher den Angriffspunkt für eine effektive antimykotische Therapie dar.

4.7 Ausblick

Curcumin zählt aktuell zu den intensiv untersuchten und diskutierten Substanzen in der medizinischen Forschung. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien veröffent- licht, die diverse Curcuminformulierungen einsetzten und die unterschiedlichen Auswir- kungen auf verschiedene Organismen beobachteten. Darunter finden sich aber nur we- nige Studien, die die Effekte von Curcumin auf Dermatophyten untersuchen. Die Effekte von photodynamisch aktiviertem Curcumin auf Dermatophyten wurden von Baltazar und Brasch untersucht (Baltazar et al. 2015; Brasch et al. 2017). In diesen Studien konnte grundsätzlich eine Wachstumsinhibition der Dermatophyten festgestellt werden. Diese war u.a. abhängig von der Curcumindosis, der Galenik des eingesetzten Curcumins, der Wellenlänge der Lichtquelle, der Lichtdosis und der Pilzart. Um die Relevanz der einzel- nen Faktoren besser zu verstehen und um Möglichkeiten einer therapeutischen Anwen- dung auszuloten, müssen die Einflüsse der verschiedenen Parameter untersucht wer- den. Besonders die Verkapselung von Curcumin in Nanopartikel scheint eine vielverspre- chende Möglichkeit darzustellen, um die schlechte Wasserlöslichkeit von Curcumin zu verbessern und so die Bioverfügbarkeit und die Penetration der Hautbarriere zu erhö-

hen. Interessante Erkenntnisse konnten Krausz et al. (Krausz et al. 2015) in ihren Untersuchungen gewinnen, in denen sie Curcumin in Nanopartikeln verkapselt auf seine antibiotische Wirkung und auch seine Wirkung *in vivo* nach topischer Applikation untersuchten. Von Krausz et al. wurde *in vitro* eine Wachstumshemmung auf *MRSA* und *Pseudomonas aeruginosa* durch Curcumin in Nanopartikeln beobachtet. Zudem konnten sie anhand von Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahmen beobachten, wie die Curcuminnanopartikel auf *MRSA* Zellen wirkten. Sechs Stunden nach Inkubation von *MRSA* mit Curcuminnanopartikeln kam es an der Zellwand, die Kontakt zu den Nanopartikeln hatte, zu einem Ödem, das zur Deformation der ganzen Zelle führte. 24 Stunden nach erfolgter Inkubation, kam es schließlich zur Zelllyse und zum Austreten des Zellinhaltes. Diese Aufnahmen legen nahe, dass die Curcuminnanopartikel durch Interaktion mit der bakteriellen Zelle die Zellwand schädigen und so schließlich zum Zelltod führen. Desweiteren stellten sie in einer *in vivo* Untersuchung am Mausmodell fest, dass Curcumin in Nanopartikeln zu einer signifikanten Verbesserung der Wundheilung verglichen mit reinem Curcumin führte. Sie postulierten, dass die curcuminhaltigen Nanopartikel die Hautbarriere besser durchdringen können. Diese neuen Ergebnisse stellen die Formulierung von Curcumin verkapselt in Nanopartikel als ein potentiell topisches Therapeutikum in Aussicht.

Weitere Aspekte, die es zu untersuchen gilt, sind die Effekte von photodynamisch aktiviertem Curcumin in unterschiedlicher Galenik auf menschliche Haut. Und schließlich muss bei guter *in vitro* und *ex vivo* Wirksamkeit die Verträglichkeit einer photodynamischen Therapie mit Curcumin in klinischen Studien untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Curcumin ein potentiell antimykotisches Therapeutikum darstellt, da sich *T. rubrum* als häufigster Erreger von Dermatophyosen, dafür generell empfänglich zeigt. Im Gegensatz zu den gängigen Antimykotika sind nahezu keine unerwünschten Symptome unter Curcumingabe beim Menschen beobachtet worden. Die größte Hürde der geringen Bioverfügbarkeit nach oraler und dermalen Applikation, kann entweder durch die Adjuvantiengabe (z.B. Piperin oder Fette) oder durch den Einbau des Curcumins in beispielsweise Nanopartikel oder durch das Lösen von Curcumin in Dimethylsulfoxid (DMSO) überwunden werden. Unter Dimethylsulfoxid konnten bereits hemmende Effekte auf das Dermatophytenwachstum beobachtet werden. Dieser wachstumsinhibierende Effekt von DMSO könnte im Sinne eines Synergismus mit

Curcumin sinnvoll in einem Kombinationspräparat genutzt werden, allerdings werden dafür relativ hohe DMSO-Konzentrationen benötigt, die mit Nebenwirkungen einhergehen können. Bei superfiziellen Dermatophyteninfektionen ist eine Photochemotherapie mit Curcumin als Photosensibilisator eine vielversprechende Option. Belichtung kann den Effekt von Curcumin entscheidend verstärken und somit eine mögliche Therapie effizienter gestalten. Unter der Verwendung von sichtbarem blauem Licht kann einerseits die maximale Photoaktivierung von Curcumin stattfinden, andererseits sind im Gegensatz zur UV-Therapie keine DNS-Schäden zu erwarten. Um die Compliance der Patienten im Rahmen einer möglichen Photochemotherapie zu erhöhen, sollte hierbei mit möglichst hohen, aber noch gut verträglichen Lichtdosen gearbeitet werden, die zu einer Verkürzung der Bestrahlungszeit führen könnten.

5 Zusammenfassung

Dermatophyten verursachen als Erreger der Dermatophytosen Infektionen der Epidermis, Haare oder Nägel. Seit den 1950er Jahren ist *T. rubrum* der häufigste Erreger der Dermatophytosen in Deutschland sowie in Nordeuropa. Eine effektive Therapie stellt sich besonders bei der Onychomykose als langwierig dar und Therapieabbrüche seitens der Patienten sind nicht selten. Zudem können die bekannten Antimykotika zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen oder durch Hemmung der CYP-P450-Enzyme zu Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten führen und es sind Resistenzen möglich.

Vor diesem Hintergrund geraten immer neue Substanzen in den Fokus der medizinischen Forschung, so auch Curcumin. Dieses ist ein farbgebender Bestandteil des Rhizoms der Pflanze *Curcuma longa*. Curcuma bzw. Curcumin wurde von der FDA (Federal Drug Administration) als generell sicher eingestuft und ist bereits in diversen klinischen Studien systemisch und topisch appliziert worden. Nachdem in vorherigen Studien die wachstumsinhibierende Wirkung von photoaktiviertem Curcumin auf *T. rubrum* beobachtet wurde, sollte in dieser Arbeit erstmalig der Einfluss von photoaktiviertem micelliertem Curcumin auf *T. rubrum* untersucht werden.

Dazu wurden sowohl Konidien als auch Myzelfragmente von 5 *T. rubrum* Stämmen gewonnen. Diese wurden entweder mit in DMSO gelöstem Curcumin oder mit micelliertem in Puffer gelöstem Curcumin versetzt und nach einer Dunkelinkubationszeit von 20 min. mit einer Dosis von 20 J/cm² und einer Wellenlänge von 420 nm bestrahlt. Anschließend erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur und in Sabouraud-Boullion. Kontrollreihen wurden mit reiner Sabouraud-Boullion, dem Lösungsmittel DMSO und dem Antimykotikum Fluconazol durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten identisch behandelte Konidien und Myzelfragmente, die nicht belichtet worden waren. Das Wachstum der Dermatophyten wurde über einen Beobachtungszeitraum von 216 Stunden bzw. 9 Tagen anhand regelmäßiger photometrischer Extinktionsmessungen und mikroskopischer Kontrollen erfasst.

Hierbei zeigte sich nach 120 Stunden bzw. 5 Tagen unter der Dosierung von 5 mg/l und 2,5 mg/l Curcumin in DMSO eine mit Fluconazol vergleichbare Wachstumshemmung.

Dagegen konnte eine Wachstumsinhibition der Dermatophyten unter den gleichen Konzentrationen der micellierten Curcuminpräparationen nicht beobachtet werden. Ebenso kam es bei den Negativkontrollen nicht zu einer Wachstumsinhibition. Nach 216 Stunden bzw. 9 Tagen kam es unter der Curcuminkonzentration von 2,5 mg/l zu einem Anwachsen von 2 der 5 Stämme, während unter 5 mg/l Curcuminkonzentration weiterhin kein Dermatophytenwachstum beobachtet werden konnte. Die Konidien und das Myzel zeigten sich ähnlich empfänglich für die eingesetzten Substanzen.

Durch die Versuche konnten die bereits beschriebenen wachstumsinhibierenden Effekte von photoaktiviertem Curcumin bestätigt und erstmalig auch an Myzel von *T. rubrum* gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass belichtetes Curcumin *in vitro* eine effektive wachstumsinhibierende Wirkung auf den Dermatophyt hat. Dabei ist offenbar die Galenik des Curcumins relevant, da micelliertes Curcumin keine antimykotischen Effekte zeigte. Die Erkenntnis, dass Myzel sich genauso empfänglich für die wachstumsinhibierende Wirkung des Curcumins zeigte wie die Konidien, stellt eine wichtige Grundlage für weitere *in vivo* Studien dar, da die Dermatophyten sich im Stratum corneum der Haut über die Aussprossung von Myzel ausbreiten und dieses somit als Angriffspunkt dienen könnte.

Anhang

A Tabellen

unbestrahlt n = 30	Tag 0		Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4		Tag 5		Tag 9	
	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD
Cur 4/DMSO	0,047	0,001	0,053	0,005	0,124	0,048	0,238	0,054	0,333	0,044	0,391	0,040	0,507	0,046
Cur 3/DMSO	0,049	0,002	0,053	0,004	0,108	0,032	0,229	0,048	0,327	0,041	0,385	0,041	0,497	0,046
Cur 2/DMSO	0,048	0,002	0,050	0,003	0,090	0,030	0,203	0,058	0,312	0,047	0,376	0,043	0,489	0,050
Cur 1/DMSO	0,054	0,003	0,055	0,003	0,073	0,014	0,162	0,062	0,268	0,071	0,348	0,056	0,507	0,057
Cur 4/micelliert	0,045	0,001	0,051	0,004	0,122	0,045	0,242	0,055	0,341	0,037	0,396	0,034	0,515	0,043
Cur 3/micelliert	0,046	0,002	0,052	0,004	0,125	0,045	0,254	0,055	0,359	0,041	0,415	0,043	0,535	0,051
Cur 2/micelliert	0,045	0,002	0,050	0,004	0,114	0,044	0,247	0,060	0,358	0,048	0,417	0,053	0,536	0,062
Cur 1/micelliert	0,047	0,003	0,053	0,005	0,115	0,048	0,246	0,070	0,357	0,056	0,416	0,050	0,525	0,050
Fluconazol	0,046	0,002	0,049	0,003	0,050	0,004	0,051	0,004	0,052	0,004	0,053	0,005	0,055	0,005
DMSO	0,046	0,002	0,054	0,004	0,144	0,040	0,280	0,039	0,371	0,039	0,424	0,041	0,526	0,047
Pufferlösung	0,042	0,002	0,041	0,002	0,041	0,002	0,041	0,002	0,042	0,002	0,042	0,002	0,044	0,003
Sabouraud	0,044	0,002	0,052	0,005	0,139	0,044	0,275	0,043	0,368	0,031	0,419	0,034	0,529	0,040

Tabelle 1: Extinktionswerte von *T. rubrum*, unbestrahlter Versuchsansatz. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus den Extinktionswerten der Inokula Myzel und Konidien der 5 *T. rubrum* Stämme jeweils im dreifachen Versuchsansatz (n=30).

bestrahlt n = 30	Tag 0		Tag 1		Tag 2		Tag 3		Tag 4		Tag 5		Tag 9	
	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD	Mittelwert Extinktion	SD
Cur 4/DMSO	0,046	0,002	0,051	0,004	0,101	0,035	0,226	0,058	0,327	0,046	0,387	0,040	0,505	0,040
Cur 3/DMSO	0,049	0,003	0,050	0,003	0,058	0,012	0,115	0,064	0,226	0,084	0,316	0,063	0,476	0,046
Cur 2/DMSO	0,047	0,002	0,047	0,002	0,047	0,002	0,047	0,002	0,047	0,003	0,048	0,004	0,145	0,149
Cur 1/DMSO	0,053	0,004	0,053	0,004	0,052	0,004	0,053	0,004	0,052	0,004	0,053	0,004	0,054	0,004
Cur 4/micelliert	0,045	0,002	0,050	0,004	0,117	0,042	0,244	0,064	0,349	0,043	0,406	0,036	0,527	0,039
Cur 3/micelliert	0,046	0,002	0,051	0,004	0,113	0,044	0,244	0,068	0,353	0,051	0,413	0,045	0,540	0,041
Cur 2/micelliert	0,044	0,001	0,048	0,003	0,094	0,030	0,221	0,058	0,340	0,039	0,403	0,040	0,533	0,042
Cur 1/micelliert	0,047	0,002	0,051	0,004	0,103	0,039	0,228	0,074	0,344	0,051	0,412	0,036	0,530	0,029
Fluconazol	0,046	0,002	0,050	0,003	0,050	0,003	0,051	0,004	0,052	0,004	0,053	0,004	0,055	0,005
DMSO	0,046	0,002	0,055	0,005	0,144	0,047	0,277	0,055	0,376	0,044	0,430	0,040	0,533	0,047
Pufferlösung	0,042	0,002	0,041	0,002	0,042	0,002	0,042	0,002	0,043	0,003	0,043	0,004	0,044	0,005
Sabouraud	0,044	0,002	0,053	0,007	0,140	0,053	0,269	0,063	0,363	0,046	0,415	0,044	0,525	0,044

Tabelle 2: Extinktionswerte von *T. rubrum*, bestrahlter Versuchsansatz. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) aus den Extinktionswerten der Inokula Myzel und Konidien der 5 *T. rubrum* Stämme jeweils im dreifachen Versuchsansatz (n=30).

bestrahlt; Tag 9 Cur 2/DMSO	Stamm 472	Stamm 423	Stamm 503	Stamm 515	Stamm 521
Mittelwert Extinktion	0,283	0,049	0,115	0,224	0,053
SD	0,078	0,004	0,168	0,203	0,008
Min.	0,145	0,045	0,044	0,049	0,045
Max.	0,369	0,055	0,457	0,515	0,068
n =	6	6	6	6	6

Tabelle 3: Extinktionswerte von *T. rubrum*, Tag 9, Behandlung mit Cur 2/DMSO, bestrahlter Versuchsansatz. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) sowie das Minimum (Min.) und das Maximum (Max.) der Extinktionen der Inokula Myzel und Konidien im dreifachen Versuchsansatz (n=6).

bestrahlt; Tag 9 Cur 1/DMSO	Stamm 472	Stamm 423	Stamm 503	Stamm 515	Stamm 521
Mittelwert Extinktion	0,054	0,054	0,050	0,056	0,056
SD	0,004	0,005	0,002	0,004	0,005
Min.	0,049	0,048	0,048	0,053	0,051
Max.	0,059	0,060	0,053	0,063	0,064
n =	6	6	6	6	6

Tabelle 4: Extinktionswerte von *T. rubrum*, Tag 9, Behandlung mit Cur 1/DMSO, bestrahlter Versuchsansatz. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) sowie das Minimum (Min.) und das Maximum (Max.) der Extinktionen nach Inokulation mit Myzelfragmenten und Konidien, jeweils mit dreifachem Versuchsansatz (n=6).

bestrahlt; Tag 9 Fluconazol	Stamm 472	Stamm 423	Stamm 503	Stamm 515	Stamm 521
Mittelwert Extinktion	0,052	0,054	0,054	0,054	0,061
SD	0,004	0,004	0,003	0,005	0,004
Min.	0,044	0,045	0,051	0,048	0,056
Max.	0,056	0,057	0,058	0,060	0,068
n =	6	6	6	6	6

Tabelle 5: Extinktionswerte von *T. rubrum*, Tag 9, Behandlung mit Fluconazol, bestrahlter Versuchsansatz. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) sowie das Minimum (Min.) und das Maximum (Max.) der Extinktionen der Inokula Myzel und Konidien im dreifachen Versuchsansatz (n=6).

Inokulum	Galenik	Curcuminkonzentration	Mittelwert: absoluter Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung	SD	Varianz	n
Myzel	DMSO	0,625 mg/l	1,015	0,091	0,008	15
		1,250 mg/l	0,977	0,117	0,014	15
		2,500 mg/l	0,314	0,403	0,162	15
		5,000 mg/l	0,004	0,007	0,000	15
	micelliert	0,625 mg/l	1,034	0,063	0,004	15
		1,250 mg/l	1,044	0,055	0,003	15
		2,500 mg/l	1,042	0,101	0,010	15
		5,000 mg/l	1,007	0,074	0,006	15
Konidien	DMSO	0,625 mg/l	0,987	0,081	0,007	15
		1,250 mg/l	0,944	0,114	0,013	15
		2,500 mg/l	0,156	0,282	0,079	15
		5,000 mg/l	0,002	0,002	0,000	15
	micelliert	0,625 mg/l	1,023	0,073	0,005	15
		1,250 mg/l	0,989	0,070	0,005	15
		2,500 mg/l	0,969	0,087	0,008	15
		5,000 mg/l	1,028	0,098	0,010	15

Tabelle 6: Errechneter Effekt der Behandlung von *T. rubrum*.

Absoluter Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung für die Behandlung mit Curcumin/DMSO und Curcumin/micelliert für alle 5 Stämme im dreifachen Ansatz (n=15).

Stamm	Galenik	Curcuminkonzentration	Mittelwert: absoluter Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung	SD	Varianz	n
472	DMSO	0,625 mg/l	1,085	0,060	0,004	6
		1,250 mg/l	0,994	0,092	0,008	6
		2,500 mg/l	0,617	0,190	0,036	6
		5,000 mg/l	0,003	0,004	0,000	6
	micelliert	0,625 mg/l	1,054	0,066	0,004	6
		1,250 mg/l	1,076	0,053	0,003	6
		2,500 mg/l	1,119	0,090	0,008	6
		5,000 mg/l	1,119	0,093	0,009	6
423	DMSO	0,625 mg/l	0,949	0,096	0,009	6
		1,250 mg/l	0,980	0,083	0,007	6
		2,500 mg/l	0,000	0,006	0,000	6
		5,000 mg/l	0,001	0,006	0,000	6
	micelliert	0,625 mg/l	0,998	0,049	0,002	6
		1,250 mg/l	1,015	0,047	0,002	6
		2,500 mg/l	0,945	0,073	0,005	6
		5,000 mg/l	0,949	0,056	0,003	6
503	DMSO	0,625 mg/l	1,004	0,056	0,003	6
		1,250 mg/l	0,887	0,109	0,012	6
		2,500 mg/l	0,145	0,350	0,122	6
		5,000 mg/l	0,002	0,003	0,000	6
	micelliert	0,625 mg/l	0,995	0,059	0,003	6
		1,250 mg/l	0,976	0,056	0,003	6
		2,500 mg/l	1,034	0,052	0,003	6
		5,000 mg/l	1,024	0,079	0,006	6
515	DMSO	0,625 mg/l	1,032	0,057	0,003	6
		1,250 mg/l	1,072	0,099	0,010	6
		2,500 mg/l	0,402	0,459	0,210	6
		5,000 mg/l	0,006	0,007	0,000	6
	micelliert	0,625 mg/l	1,070	0,077	0,006	6
		1,250 mg/l	1,049	0,054	0,003	6
		2,500 mg/l	0,991	0,079	0,006	6
		5,000 mg/l	0,974	0,055	0,003	6
521	DMSO	0,625 mg/l	0,934	0,074	0,005	6
		1,250 mg/l	0,870	0,078	0,006	6
		2,500 mg/l	0,011	0,016	0,000	6
		5,000 mg/l	0,001	0,003	0,000	6
	micelliert	0,625 mg/l	1,024	0,071	0,005	6
		1,250 mg/l	0,966	0,072	0,005	6
		2,500 mg/l	0,939	0,097	0,009	6
		5,000 mg/l	1,021	0,046	0,002	6

Tabelle 7: Errechneter Effekt der Behandlung von *T. rubrum*.

Absoluter Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung für die Behandlung mit Curcumin/DMSO und Curcumin/micelliert für Myzel und Konidien im dreifachen Ansatz (n=6).

Galenik	Curcuminkonzentration	Mittelwert: absoluter Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung	SD	Varianz	n
DMSO	0,625 mg/l	1,001	0,086	0,007	30
	1,250 mg/l	0,961	0,115	0,013	30
	2,500 mg/l	0,235	0,351	0,123	30
	5,000 mg/l	0,003	0,005	0,000	30
micelliert	0,625 mg/l	1,028	0,068	0,005	30
	1,250 mg/l	1,016	0,068	0,005	30
	2,500 mg/l	1,006	0,100	0,010	30
	5,000 mg/l	1,018	0,086	0,007	30

Tabelle 8: Errechneter Bestrahlungseffekt auf *T. rubrum*.

Absoluter Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung für die Behandlung mit Curcumin/DMSO und Curcumin/micelliert für Myzel und Konidien aller 5 Stämme im dreifachen Ansatz (n=30).

B Kodierung

				Beschreibung
Bestrahlung:		Variable:		
a_	unbestrahlt	a/b	= 0	0 Joule
b_	bestrahlt	a/b	= 1	20 Joule
Stamm:		Variable:		
α1	472	i	= 1	
α2	423	i	= 2	
α3	503	i	= 3	
α4	515	i	= 4	
α5	521	i	= 5	
Inokulum:		Variable:		
β1	Myzel	j	= 1	
β2	Konidien	j	= 2	
Zusatz:		Variable:		
γ0	<leer>	k	= 0	Trägerplatte LEER
γ1	CUR_DMSO	k	= 1	Curcumin mit DMSO
γ2	CUR	k	= 2	Curcumin micelliert
γ3	Fluc	k	= 3	Fluconazol
γ4	DMSO	k	= 4	DMSO
γ5	Puffer	k	= 5	Pufferlösung
γ6	Sab	k	= 6	Sabouraud
Curcumin-Konzentration:		Variable:		
δ0(k)	0,000 mg/l	l	= 0	Kein Curcumin -> Fluc, DMSO, Puffer, Sab, Leer
δ1(k)	0,625 mg/l	l	= 1	Cur 4
δ2(k)	1,250 mg/l	l	= 2	Cur 3
δ3(k)	2,500 mg/l	l	= 3	Cur 2
δ4(k)	5,000 mg/l	l	= 4	Cur 1
Probe:		Variable:		
Ansatz 1		w	= 1	
Ansatz 2		w	= 2	
Ansatz 3		w	= 3	
Messung an Tag:		Variable:		
Tag 0		d	= 0	
Tag 1		d	= 1	
Tag 2		d	= 2	
Tag 3		d	= 3	
Tag 4		d	= 4	
Tag 5		d	= 5	
Tag 9		d	= 9	

Der absolute Effekt der Bestrahlung relativ zum absoluten Effekt ohne Bestrahlung:

$$y_{ijklw} = (b_{ijklw9} - b_{ijklw0}) / (a_{ijklw9} - a_{ijklw0})$$

Literaturverzeichnis

- Akram Randhawa, Muhammad (2008): „Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Inhibits the Germination of *Candida albicans* and the Arthrospores of *Trichophyton mentagrophytes*“. In: *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 49 (2), S. 125–128, doi: 10.3314/jjmm.49.125.
- Al-Asmari, Fahad; Mereddy, Ram; Sultanbawa, Yasmina (2017): „A novel photosensitization treatment for the inactivation of fungal spores and cells mediated by curcumin“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 173, S. 301–306, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.06.009.
- Anand, Preetha; Kunnumakkara, Ajaikumar B.; Newman, Robert A.; et al. (2007): „Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises“. In: *Molecular Pharmaceutics*. 4 (6), S. 807–818, doi: 10.1021/mp700113r.
- Apisariyakul, A.; Vanittanakom, N.; Buddhasukh, D. (1995): „Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae)“. In: *Journal of Ethnopharmacology*. 49 (3), S. 163–169.
- Baltazar, Ludmila Matos; Krausz, Aimee E.; Souza, Ana Camila Oliveira; et al. (2015): „*Trichophyton rubrum* is inhibited by free and nanoparticle encapsulated curcumin by induction of nitrosative stress after photodynamic activation“. In: *PloS One*. 10 (3), S. e0120179, doi: 10.1371/journal.pone.0120179.
- Berneburg, M.; Schwarz, T. (2013): „Wirkmechanismen der Phototherapie“. In: *Der Hautarzt*. 64 (5), S. 338–344, doi: 10.1007/s00105-012-2509-6.
- Boyko, Edward J.; Ahroni, Jessie H.; Cohen, Victoria; et al. (2006): „Prediction of diabetic foot ulcer occurrence using commonly available clinical information: the Seattle Diabetic Foot Study“. In: *Diabetes Care*. 29 (6), S. 1202–1207, doi: 10.2337/dc05-2031.

- Brasch, Jochen (2010): „Pathogenesis of tinea: Pathogenesis of tinea“. In: *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 8 (10), S. 780–786, doi: 10.1111/j.1610-0387.2010.07481.x.
- Brasch, Jochen; Freitag-Wolf, Sandra; Beck-Jendroschek, Vera; et al. (2017): „Inhibition of dermatophytes by photodynamic treatment with curcumin“. In: *Medical Mycology*. 55 (7), S. 754–762, doi: 10.1093/mmy/myw139.
- Brayton, C. F. (1986): „Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review“. In: *The Cornell Veterinarian*. 76 (1), S. 61–90.
- Capriotti, Kara; Capriotti, Joseph A. (2012): „Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology“. In: *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 5 (9), S. 24–26.
- Chaurasia, Sundeep; Patel, Ravi R.; Chaubey, Pramila; et al. (2015): „Lipopolysaccharide based oral nanocarriers for the improvement of bioavailability and anticancer efficacy of curcumin“. In: *Carbohydrate Polymers*. 130, S. 9–17, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.062.
- Cronin, Leah J.; Mildren, Richard P.; Moffitt, Michelle; et al. (2014): „An investigation into the inhibitory effect of ultraviolet radiation on *Trichophyton rubrum*“. In: *Lasers in Medical Science*. 29 (1), S. 157–163, doi: 10.1007/s10103-013-1287-4.
- Dai, T.; Tegos, G.P.; Rolz-Cruz, G.; et al. (2008): „Ultraviolet C inactivation of dermatophytes: implications for treatment of onychomycosis“. In: *British Journal of Dermatology*. 158 (6), S. 1239–1246, doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08549.x.
- Dovigo, Livia N.; Pavarina, Ana Cláudia; Ribeiro, Ana Paula D.; et al. (2011): „Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*“. In: *Photochemistry and Photobiology*. 87 (4), S. 895–903, doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x.
- Du, Lina; Feng, Xue; Xiang, Xiaoqin; et al. (2016): „Wound Healing Effect of an in Situ Forming Hydrogel Loading Curcumin-Phospholipid Complex“. In: *Current Drug*

Delivery. 13 (1), S. 76–82.

Duse, Lili; Pinnapireddy, Shashank Reddy; Strehlow, Boris; et al. (2018): „Low level LED photodynamic therapy using curcumin loaded tetraether liposomes“. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 126 , S. 233–241, doi: 10.1016/j.ejpb.2017.10.005.

Duteil, Luc; Cardot-Leccia, Nathalie; Queille-Roussel, Catherine; et al. (2014): „Differences in visible light-induced pigmentation according to wavelengths: a clinical and histological study in comparison with UVB exposure“. In: *Pigment Cell & Melanoma Research*. 27 (5), S. 822–826, doi: 10.1111/pcmr.12273.

Fowkes, F. Gerald R.; Rudan, Diana; Rudan, Igor; et al. (2013): „Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis“. In: *Lancet (London, England)*. 382 (9901), S. 1329–1340, doi: 10.1016/S0140-6736(13)61249-0.

Fritsche, Olaf (2016): *Mikrobiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi: 10.1007/978-3-662-49729-6.

Gold, Michael H. (2011): *Photodynamic Therapy in Dermatology*. Springer.

Groß, Uwe (2009): *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2., Auflage. Stuttgart: Thieme.

Gupta, A.; Simpson, F. (2012): „Device-based therapies for onychomycosis treatment“. In: *Skin Therapy Letter*. 17 (9), S. 4–9.

Hof, Herbert (2003): *Mykologie für Mediziner: Grundlagen, Pathogenese, Manifestationen, Diagnostik, Therapie ; 64 Tabellen*. Thieme.

Hof, Herbert; Dörries, Rüdiger (2014): *Medizinische Mikrobiologie*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).

de Hoog, G. Sybren; Dukik, Karolina; Monod, Michel; et al. (2017): „Toward a Novel

- Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes“. In: *Mycopathologia*. 182 (1–2), S. 5–31, doi: 10.1007/s11046-016-0073-9.
- Hoog, Gerrit S. de; Guarro Safont, Josep; Gené, J.; et al. (2000): *Atlas of clinical fungi*. 2nd edition. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Kleinpenning, Marloes M.; Smits, Tim; Frunt, Marjolein H. A.; et al. (2010): „Clinical and histological effects of blue light on normal skin“. In: *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 26 (1), S. 16–21, doi: 10.1111/j.1600-0781.2009.00474.x.
- Kolb, K. H.; Jaenicke, G.; Kramer, M.; et al. (1967): „ABSORPTION, DISTRIBUTION AND ELIMINATION OF LABELED DIMETHYL SULFOXIDE IN MAN AND ANIMALS“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 141 (1 Biological Ac), S. 85–95, doi: 10.1111/j.1749-6632.1967.tb34869.x.
- Krausz, Aimee E.; Adler, Brandon L.; Cabral, Vitor; et al. (2015): „Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent“. In: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 11 (1), S. 195–206, doi: 10.1016/j.nano.2014.09.004.
- Liebmann, Joerg; Born, Matthias; Kolb-Bachofen, Victoria (2010): „Blue-Light Irradiation Regulates Proliferation and Differentiation in Human Skin Cells“. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 130 (1), S. 259–269, doi: 10.1038/jid.2009.194.
- Liu, Chi-Hsien; Lee, Wei-Shiou; Wu, Wei-Chi (2016): „Photodynamic inactivation against *Pseudomonas aeruginosa* by curcumin microemulsions“. In: *RSC Advances*. 6 (67), S. 63013–63022, doi: 10.1039/C6RA10193C.
- Llinares, M. E.; Bermúdez, M.; Fuster, J. L.; et al. (2005): „TOXICITY TO TOPICAL DIMETHYL SULFOXIDE IN A PEDIATRIC PATIENT WITH ANTHRACYCLINE EXTRAVASATION“. In: *Pediatric Hematology and Oncology*. 22 (1), S. 49–52, doi: 10.1080/08880010590896279.

- Mahmoud, Bassel H.; Hexsel, Camile L.; Hamzavi, Iltefat H.; et al. (2008): „Effects of Visible Light on the Skin“. In: *Photochemistry and Photobiology*. 84 (2), S. 450–462, doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00286.x.
- Martinez-Rossi, Nilce M.; Bitencourt, Tamires A.; Peres, Nalu T. A.; et al. (2018): „Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs: Mechanisms and Prospectus“. In: *Frontiers in Microbiology*. 9, S. 1108, doi: 10.3389/fmicb.2018.01108.
- Meffert, B.; Meffert, H. (2000): „[Optical radiation and its effect on the skin]“. In: *Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering*. 45 (4), S. 98–104.
- Moorhead, Sian; Maclean, Michelle; MacGregor, Scott J.; et al. (2016): „Comparative Sensitivity of Trichophyton and Aspergillus Conidia to Inactivation by Violet-Blue Light Exposure“. In: *Photomedicine and Laser Surgery*. 34 (1), S. 36–41, doi: 10.1089/pho.2015.3922.
- Mügge, Claudia; Haustein, Uwe-Frithjof; Nenoff, Pietro (2006): „[Causative agents of onychomycosis--a retrospective study]“. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*. 4 (3), S. 218–228, doi: 10.1111/j.1610-0387.2006.05877.x.
- Nenoff, P.; Ginter-Hanselmayer, G.; Tietz, H.-J. (2012): „Onychomykose – ein Update: Teil 1 – Prävalenz, Epidemiologie, disponierende Faktoren und Differenzialdiagnose“. In: *Der Hautarzt*. 63 (1), S. 30–38, doi: 10.1007/s00105-011-2251-5.
- Nenoff, Pietro; Krüger, Constanze; Ginter-Hanselmayer, Gabriele; et al. (2014): „Mykologie - ein Update. Teil 1: Dermatomykosen: Erreger, Epidemiologie und Pathogenese: Mykologie - an update. Teil 1“. In: *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 12 (3), S. 188–212, doi: 10.1111/ddg.12245_suppl.
- Olver, I. N.; Aisner, J.; Hament, A.; et al. (1988): „A prospective study of topical dimethyl sulfoxide for treating anthracycline extravasation“. In: *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 6 (11), S. 1732–1735, doi: 10.1200/JCO.1988.6.11.1732.

- Plewig, Gerd; Ruzicka, Thomas; Kaufmann, Roland; et al. (Hrsg.) (2018): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. 7., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin: Springer.
- Prasad, Sahdeo; Aggarwal, Bharat B. (2011): „Turmeric, the Golden Spice: From Traditional Medicine to Modern Medicine“. In: Benzie, Iris F. F.; Wachtel-Galor, Sissi (Hrsg.) *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd. Aufl. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- Priyadarsini, K. Indira (2013): „Chemical and structural features influencing the biological activity of curcumin“. In: *Current Pharmaceutical Design*. 19 (11), S. 2093–2100.
- Priyadarsini, Kavirayani (2014): „The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent“. In: *Molecules*. 19 (12), S. 20091–20112, doi: 10.3390/molecules191220091.
- Ravindran, P. N (2007): *Turmeric the genus Curcuma*. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis.
- Sanoj Rejinold, N.; Sreerekha, P.R.; Chennazhi, K.P.; et al. (2011): „Biocompatible, biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly (N-isopropylacrylamide) nanocarrier for curcumin drug delivery“. In: *International Journal of Biological Macromolecules*. 49 (2), S. 161–172, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.04.008.
- Scheidt-Nave, Christa; Kamtsiuris, Panagiotis; Gößwald, Antje; et al. (2012): „German health interview and examination survey for adults (DEGS) - design, objectives and implementation of the first data collection wave“. In: *BMC public health*. 12 , S. 730, doi: 10.1186/1471-2458-12-730.
- Schiborr, Christina; Kocher, Alexa; Behnam, Dariush; et al. (2014): „The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes“. In: *Molecular Nutrition & Food Research*. 58 (3), S. 516–527, doi: 10.1002/mnfr.201300724.

- Schmid-Wendtner, M.-H.; Korting, H. (2008): „[Topical terbinafine. Reduction of duration of therapy for tinea pedis]“. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*. 59 (12), S. 986–991, doi: 10.1007/s00105-008-1552-9.
- Seebacher, Claus (2001): *Dermatomykosen: Grundlagen und Therapie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Seebacher, Claus; Bouchara, Jean-Philippe; Mignon, Bernard (2008): „Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections“. In: *Mycopathologia*. 166 (5–6), S. 335–352, doi: 10.1007/s11046-008-9100-9.
- Seifert, Roland (2018): „Antimykotika“. In: *Basiswissen Pharmakologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg S. 417–424, doi: 10.1007/978-3-662-56303-8_35.
- Shoba, G.; Joy, D.; Joseph, T.; et al. (1998): „Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers“. In: *Planta Medica*. 64 (4), S. 353–356, doi: 10.1055/s-2006-957450.
- Smijs, Threes G. M.; Pavel, Stan (2011): „The Susceptibility of Dermatophytes to Photodynamic Treatment with Special Focus on *Trichophyton rubrum*“. In: *Photochemistry and Photobiology*. 87 (1), S. 2–13, doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00848.x.
- Suerbaum, Sebastian; Burchard, Gerd-Dieter; Kaufmann, Stefan H.E.; et al. (Hrsg.) (2016): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), doi: 10.1007/978-3-662-48678-8.
- Vaughn, Alexandra R.; Branum, Amy; Sivamani, Raja K. (2016): „Effects of Turmeric (*Curcuma longa*) on Skin Health: A Systematic Review of the Clinical Evidence: Effects of *Curcuma longa* on Skin Health“. In: *Phytotherapy Research*. 30 (8), S. 1243–1264, doi: 10.1002/ptr.5640.
- Weitzman, I.; Summerbell, R. C. (1995): „The dermatophytes“. In: *Clinical Microbiology Reviews*. 8 (2), S. 240–259.

Wuthi-udomlert, M.; Grisanapan, W.; Luanratana, O.; et al. (2000): „Antifungal activity of *Curcuma longa* grown in Thailand“. In: *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 31 Suppl 1 , S. 178–182.

Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Jochen Brasch bedanken, der diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte. Vielen Dank für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die immer zuverlässige Betreuung und für die geduldige Zusammenarbeit.

Auch bei Frau Vera Beck-Jendroschek, Angela Preschke und Karin Voss möchte ich mich ganz herzlich für die gesamte Zeit im mykologischen Labor bedanken. Ihr habt mir geduldig das Arbeiten im Labor gezeigt, habt mir in der gesamten Zeit bei aufkommenden Fragen immer zur Seite gestanden und mich bei meinem Vorhaben stets mit Hilfsbereitschaft und eurer langjährigen Erfahrung im Labor unterstützt. Vielen Dank auch an alle weiteren Mitarbeiter des mykologischen Labors des Kieler UKSH, die mir immer hilfsbereit und freundlich entgegengetreten sind.

Herrn Dr. Thomas Möbius vom Institut für Medizinische Informatik und Statistik am UKSH Kiel, möchte ich ebenfalls danken für die gute Betreuung bei der Erstellung der Statistik meiner Ergebnisse und der Hilfestellung bei der Veröffentlichung dieser Ergebnisse.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch Bendix danken, der mich unermüdlich über die drei Jahre an dieser Arbeit motiviert, unterstützt und mir den Rücken freigehalten hat. Auch möchte ich Gisbert und seinem Team danken, dafür dass ich eure Räumlichkeiten über Wochen zum Schreiben dieser Arbeit nutzen durfte und ihr mir diese Zeit so angenehm wie möglich gestaltet habt. Hierbei möchte ich zudem besonders Annemarie für das überaus aufmerksame Korrekturlesen danken.

Und natürlich möchte ich mich auch bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich in allem zu jeder Zeit unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Ort, Datum, Unterschrift